

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie se zaměřením na vzdělávání – Biologie se zaměřením na vzdělávání



Klára Frimlová

**Mutace genů biosyntézy brassinosteroidů a jejich vliv na fenotyp rostlin**  
**Mutations in brassinosteroid biosynthetic genes and their effects on plant phenotype**

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Olga Rothová, Ph.D.

Praha, 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 11. 5. 2016

.....  
Klára Frimlová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Olze Rothové, Ph.D. za velkou oporu, její cenné rady a odborný dohled při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě podporovali po dobu celého studia a při vypracování této práce.

## **Abstrakt**

Brassinosteroidy jsou významnou skupinou rostlinných hormonů, jejichž přítomnost v rostlinách ovlivňuje anatomii, morfologii a vývoj rostlin. Jsou obsaženy ve všech vegetativních a hlavně generativních orgánech. Jejich biosyntéza probíhá přes dvě hlavní dráhy pojmenované jako časná C-6 oxidační dráha a pozdní C-6 oxidační dráha. Biosyntéza brassinosteroidů je katalyzována množstvím enzymů převážně ze skupiny cytochromů P450. Mutace genů ovlivňující biosyntézu brassinosteroidů byly zkoumány především u rostlin *Arabidopsis thaliana* L., *Pisum sativum* L., *Solanum lycopersicum* L. a *Oryza sativa* L. Vlivem mutací dochází ke změnám složení i množství brassinosteroidů v rostlinách. U mutantních rostlin se redukováný obsah brassinosteroidů projevuje typickým fenotypem, kterým je redukováný vzrůst, redukováná velikost rostlinných orgánů a tmavě zelená barva listů. Fenotyp mutantů se dá zvrátit exogenní aplikací brassinosteroidů, která je však závislá na koncentraci aplikované látky. Při vyšších koncentracích dochází převážně k inhibici růstu kořenů.

**Klíčová slova: brassinosteroidy, biosyntéza, mutant, fenotyp**

## **Abstract**

Brassinosteroids are important group of phytohormones, whose presence affects anatomy, morphology and development of plants. They occur in all vegetative and mainly generative organs. Brassinosteroids are biosynthesized *via* two main paths named early C-6 oxidation pathway and late C-6 oxidation pathway. Brassinosteroid biosynthesis is catalyzed by enzymes from the group of cytochrome P450. Gene mutations - which affect brassinosteroid biosynthesis - have been studied especially in *Arabidopsis thaliana* L., *Pisum sativum* L., *Solanum lycopersicum* L. and *Oryza sativa* L. Mutations lead to changes in the composition and amount of brassinosteroids in plants. The reduced content of brassinosteroids is manifested by typical phenotype that includes reduced growth, reduced size of plant organs, and dark green leaves in mutant plants. The mutant phenotype can be reversed by exogenous application of brassinosteroids, which is nevertheless dependent on the concentration of the brassinosteroids used. Higher concentrations of brassinosteroids cause mostly inhibition of root elongation.

**Keywords: brassinosteroids, biosynthesis, mutant, phenotype**

## Seznam zkratek

<b>22-OH-3-on</b>	(22S, 24R)-22-hydroxy-5 $\alpha$ -ergostan-3-on
<b>22-OH-4-en-3-on</b>	(22S, 24R)-22-hydroxyergost-4-en-3-on
<b>22-OHCR</b>	22 $\alpha$ -hydroxycampesterol
<b>24-MC</b>	24-methylencholesterol
<b>3DT</b>	3-dehydroteasteron
<b>3-epi-6-deoxoCT</b>	3-epi-6-deoxocathasteron
<b>3-on</b>	(24R)-24-methyl-5 $\alpha$ -cholestan-3-on
<b>4-en-3-on</b>	(24R)-24-methylcholest-4-en-3-on
<b>6-deoxo3DT</b>	3-dehydro-6-deoxoteasteron
<b>6-deoxoCS</b>	6-deoxocastasteron
<b>6-deoxoCT</b>	6-deoxocathasteron
<b>6-deoxoTE</b>	6-deoxoteasteron
<b>6-deoxoTY</b>	6-deoxotyphasterol
<b>6-OHCN</b>	6 $\alpha$ -hydroxycampestanol
<b>6-OHCS</b>	6 $\alpha$ -hydroxycastasteron
<b>6-OHCT</b>	6 $\alpha$ -hydroxycathasteron
<b>6-oxoCN</b>	6-oxocampestanol
<b>BL</b>	brassinolid
<b>BR</b>	brassinosteroid
<b>CN</b>	campestanol
<b>CR</b>	campesterol
<b>CS</b>	castasteron
<b>CT</b>	cathasteron
<b>GC-MS</b>	plynová chromatografie – hmotnostní spektrofotometrie
<b>HPLC</b>	vysokoučinná kapalinová chromatografie
<b>MNU</b>	N-methyl-N-nitrosourea
<b>MVA</b>	mevalonová kyselina
<b>SPAD</b>	relativní obsah chlorofylu
<b>TE</b>	teasteron
<b>TY</b>	typhasterol

## Obsah

Úvod .....	1
<b>1. Brassinosteroidy .....</b>	<b>2</b>
<b>2. Biosyntéza brassinosteroidů .....</b>	<b>3</b>
2.1. Syntéza campesterolu a campestanolu .....	3
2.2. Časná C-6 oxidační dráha.....	3
2.3. Pozdní C-6 oxidační dráha .....	4
<b>3. Mutanti vyskytující se u huseníčku (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.) .....</b>	<b>7</b>
3.1. Mutant huseníčku - <i>dwarf4</i> ( <i>dwf4-1</i> ) .....	7
3.2. Mutant huseníčku – <i>cpd</i> ( <i>constitutive photomorphogenesis and dwarfism</i> ).....	8
3.3. Mutant huseníčku – <i>de-etiolated2</i> ( <i>det2</i> ).....	9
3.4. Mutant huseníčku - <i>dwarf7</i> ( <i>dwf7-1</i> ) .....	10
3.5. Mutant huseníčku – <i>dwarf1</i> .....	11
3.6. Mutant huseníčku – <i>dwf1-2</i> ( <i>dim</i> ).....	12
3.7. Mutant huseníčku - <i>dwf5</i> .....	13
<b>4. Mutanti vyskytující se u rajčete (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) .....</b>	<b>13</b>
4.1. Mutant rajčete – <i>dumpy</i> ( <i>dpy</i> ).....	13
4.2. Mutant rajčete – <i>extreme dwarf</i> ( <i>d<sup>x</sup></i> ) .....	14
<b>5. Mutanti vyskytující se u hrachu (<i>Pisum sativum</i> L.) .....</b>	<b>14</b>
5.1. Mutant hrachu - <i>lkb</i> .....	14
5.2. Mutant hrachu - <i>lk</i> .....	16
<b>6. Mutanti vyskytující se u rýže (<i>Oryza sativa</i> L.) .....</b>	<b>17</b>
6.1. Mutant rýže ( <i>Oryza sativa</i> L. cv. Nipponbare) - <i>brd1</i> .....	17
6.2. Mutant rýže ( <i>Oryza Sativa</i> L. cv. Nipponbare) – <i>dwarf2</i> ( <i>brd2</i> ).....	19
6.3. Mutant rýže – <i>ebisu dwarf</i> ( <i>d2</i> ) .....	21
6.4. Mutant rýže – <i>dwarf11</i> ( <i>d11</i> ).....	22
6.5. Mutant rýže – <i>sg4</i> .....	23
6.6. Mutant rýže – <i>lhdd10</i> .....	23
<b>7. Mutant vyskytující se u ječmene (<i>Hordeum vulgare</i> L.).....</b>	<b>24</b>

7.1. Mutant ječmene - <i>HvDWARF</i> .....	24
<b>8. Mutant vyskytující se u bobu (<i>Vicia faba</i> L.) .....</b>	<b>25</b>
8.1. Mutant bobu – <i>bdd1</i> ( <i>brassinosteroid deficient dwarf 1</i> ) .....	25
<b>9. Mutant vyskytující se u povíjnice (<i>Pharbitis nil</i> L.).....</b>	<b>26</b>
9.1. Mutant povíjnice - <i>kbt</i> .....	26
<b>10. Mutanti vyskytující se u kukuřice (<i>Zea mays</i> L.).....</b>	<b>27</b>
10.1. Mutant kukuřice – <i>nana plant 1</i> ( <i>na1</i> ).....	27
10.2. Mutant kukuřice – <i>brd1-m1</i> .....	27
<b>11. Diskuze a závěr: .....</b>	<b>28</b>
<b>12. Seznam použité literatury .....</b>	<b>34</b>

## Úvod

Brassinosteroidy jsou rostlinné hormony, které jsou důležité pro normální růst a vývoj rostlin. Jejich výskyt, syntéza a význam jsou studovány více než třicet let od prvního objeveného brassinosteroidu brassinolidu v roce 1979. Od té doby bylo objeveno přes 60 přirozeně se vyskytujících brassinosteroidů. Některé z nich byly napřed syntetizovány v laboratořích a teprve potom objeveny v rostlinách. Vyskytují se ve všech rostlinných orgánech od kořenů přes stonky, listy až po pyl a semena (Bajguz a Tretyn 2003a).

Jejich biosyntéza navazuje na biosyntézu rostlinných steroidů a probíhá přes dvě hlavní dráhy pojmenované jako časná C-6 oxidační dráha a pozdní C-6 oxidační dráha. Postupem času se však ukazuje, že existují i další alternativní dráhy a propojení mezi C-6 oxidačními drahami, přes které by biosyntéza brassinosteroidů mohla probíhat (Fujioka a Yokota 2003). Největší přínos k objasnění dané problematiky přinesli především japonští vědci, kteří se věnují výzkumu brassinosteroidů už od jejich počátků.

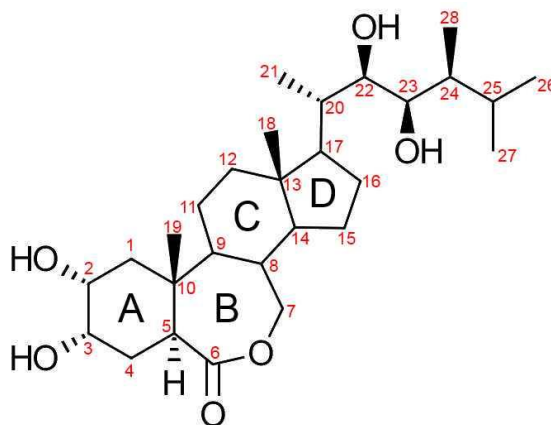
V této práci se budu zabývat rostlinami, které nesou mutace v genech podílejících se na biosyntéze brassinosteroidů. Tyto mutantní rostliny se vyznačují specifickým fenotypem, který je způsoben vlivem mutace na obsah jednotlivých brassinosteroidů obsažených v rostlinných orgánech. Je však zjištěno, že již nízké koncentrace exogenně aplikovaných brassinosteroidů stimulují růst mutantních rostlin. Ve vysokých koncentracích jsou brassinosteroidy pro rostlinu spíše toxické a růst inhibují.

Rozdíly mezi mutantními a kontrolními rostlinami se v první řadě využívají k zjištění katalytických funkcí enzymů v biosyntetických dráhách brassinosteroidů. Cílem této práce je shrnout známé poznatky o rostlinách, které nesou mutace v genech podílejících se na biosyntéze brassinosteroidů. Důraz bude kladen především na působení vlivu těchto mutací na biochemické vlastnosti a fenotyp rostlin.



## 1. Brassinosteroidy

Brassinosteroidy (BR) v dnešní době reprezentují šestou skupinu přirozeně se vyskytujících rostlinných hormonů spolu s auxiny, gibereliny, cytokininy, kyselinou abscisovou a etylenem (Bajguz a Tretyn 2003a). Prvním objeveným brassinosteroidem byl brassinolid (BL) (Obr. 1) v pylu řepky (*Brassica napus* L.) v roce 1979 (Grove a kol., 1979).



**Obr. 1: Strukturní chemický vzorec brassinolidu (podle Yokota 1997)**

Od té doby bylo objeveno více jak 65 různých přírodních brassinosteroidů (BR) (Bajguz a Tretyn 2003a), které se vyskytují napříč spektrem rostlinné říše a můžeme je nalézt jak u krytosemenných a nahosemenných rostlin tak u mechorostů a řas (Bajguz a Tretyn 2003b). Byly objeveny ve všech rostlinných orgánech, jako jsou kořeny, stonky, listy, květy, pyl a semena (Fujioka a Sakurai 1997a). Nicméně bylo zjištěno, že pyl a nezralá semena obsahují větší množství brassinosteroidů (1-100 ng na g čerstvé biomasy) než vegetativní orgány (0,01-0,1 ng na g čerstvé biomasy) (Rao a kol., 2002). Druhým objeveným brassinosteroidem byl castasteron, který byl v roce 1982 izolován z hmyzích hálek na kaštanovníku (*Castanea crenata* L.) (Khripach a kol., 2000).

Mezi vývojové procesy, které brassinosteroidy ovlivňují, patří například klíčení semen, rhizogeneze, kvetení, senescence listů, prodlužování a dělení buněk (Rao a kol., 2002, Bajguz 2007). Rostliny, jakožto přisedlé organismy, se musejí za svůj život vypořádávat s celou řadou biotických i abiotických stresů. Pro brassinosteroidy je charakteristická schopnost chránit rostliny před těmito stresy jako je například sucho, extrémní teploty, těžké kovy, herbicidní poranění a salinita (Bajguz a Tretyn 2003a).

Z chemického hlediska se jedná o deriváty 5 $\alpha$ -cholestanu a jejich strukturální rozmanitost pramení z typu a pozice funkčních skupin v kruhu A, B a postranním řetězci. Můžeme je rozdělit podle délky postranního řetězce na C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub> a C<sub>29</sub> brassinosteroidy (Yokota 1997).

## 2. Biosyntéza brassinosteroidů

Brassinolid a castasteron patří k nejvíce bioaktivním brassinosteroidům s četným výskytem v rostlinné říši. Z tohoto důvodu začaly být jejich biosyntetické dráhy pravděpodobně nejvíce zkoumány. Předpokládá se, že brassinosteroidy jsou syntetizovány z rostlinných steroidů, se kterými mají společný postranní řetězec (Fujioka a Sakurai, 1997b).

Mezi dvě hlavní biosyntetické dráhy brassinosteroidů patří časná C-6 oxidační dráha a pozdní C-6 oxidační dráha (Fujioka a Yokota 2003), které byly postupně objasňovány pokusy především na barvínku (*Catharanthus roseus* L.) a huseníčku (*Arabidopsis thaliana* L.). Časná a pozdní C6-oxidační dráze předchází několik důležitých kroků, mezi které patří syntéza campesterolu a campestanolu.

### 2.1. Syntéza campesterolu a campestanolu

Syntéza campesterolu (CR) probíhá přes řadu chemických reakcí, jak ukazuje obr. 2. Prvou reakcí biosyntézy je tvorba cyklického triterpenoidu cykloartenolu ze squalenu. Metylací cykloartenolu S-adenosylmethioninem vzniká 24-methylen-cykloartanol, který následně podléhá 4 $\beta$ -demetylací. Dochází k otevření epoxidového kruhu a vzniku obtusifoliolu. Následně dalšími demetylacemi na čtvrtém a čtrnáctém uhlíku vzniká episterol, který je přeměněn na 5-dehydroepisterol. Metabolickou přeměnou 5-dehydroepisterolu vzniká 24-methylencholesterol (24-MC). V posledním kroku vzniká z 24-MC již zmiňovaný campesterol (Sakurai 1999). Následuje přeměna campesterolu na campestanol (CN) přes dva intermediáty a to (24R)-24-methylcholest-4-en-3-on (4-en-3-on) a (24R)-24-methyl-5 $\alpha$ -cholestan-3-on (3-on) (Fujioka a kol., 1997).

### 2.2. Časná C-6 oxidační dráha

Kroky časně C-6 oxidační dráhy byly zkoumány především na kultivovaných buňkách barvínku a huseníčku prostřednictvím pokusů, ke kterým se používaly deuteriem značené intermediáty biosyntézy BR. Tkáňové kultury se nechaly určitou dobu kultivovat se značeným intermediátem. Poté byly metabolity biosyntetické dráhy intermediátů extrahovány, purifikovány a analyzovány především pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrofotometrie (GC-MS) (Suzuki a kol., 1994; Suzuki a kol., 1995a; Fujioka a kol., 2000) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Fujioka a kol., 1995; Suzuki a kol., 1995a). Tyto pokusy potvrdily následující kroky časně C6-oxidační dráhy.

U barvínku biosyntéza brassinolidu probíhající přes časnou C-6 oxidační dráhu začíná campestanolem (CN), který je následně metabolizován na 6 $\alpha$ -hydroxycampestanol (6-OHCN) a 6-oxocampestanol (6-oxoCN) (Suzuki a kol., 1995b). Následným intermediátem je cathasteron (CT), který byl v kultivovaných buňkách barvínku objeven v roce 1995 (Fujioka a kol., 1995), jeho syntéza z 6-oxocampestanolu však byla prokázána až o pět let později (Fujioka a kol., 2000). Cathasteron je

prekurzorem teasteronu (TE) (Fujioka a kol., 1995). Biosyntéza dále pokračuje z teasteronu přes typhasterol (TY) a castasteron (CS). Časná oxidační dráha zahrnující reakční kroky  $TE \rightarrow TY$ ,  $TY \rightarrow TE$  a  $TY \rightarrow CS$  byla prokázána kromě sazenic barvínku i v sazenicích rýže (*Oryza sativa* L.) a tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) (Suzuki a kol., 1995a), což naznačuje, že u nich též probíhá biosyntéza brassinosteroidů časnou C6-oxidační drahou. Syntéza typhasterolu z teasteronu pravděpodobně probíhá přes 3-dehydroteasteron (3DT) (Suzuki a kol., 1994). Produkt biosyntetické dráhy brassinolid (BL) byl detekován u barvínku (Suzuki a kol., 1995a) a u huseníčku (Fujioka a kol., 1998).

### 2.3. Pozdní C-6 oxidační dráha

Pozdní C-6 oxidační dráha začíná stejně jako časná C-6 oxidační dráha campestanolem (CN), který je přeměněn na 6-deoxocathasteron (6-deoxoCT) a ten na 6-deoxoteasteron (6-deoxoTE) (Noguchi a kol., 2000). Kroky  $CN \rightarrow 6\text{-deoxoCT}$  a  $6\text{-deoxoCT} \rightarrow 6\text{-deoxoTE}$  byly poprvé dokázány v sazenicích huseníčku pomocí experimentů s deuteriem značenými intermediáty biosyntézy BR (Noguchi a kol., 2000). Metabolická dráha  $CN \rightarrow 6\text{-deoxoCT} \rightarrow 6\text{-deoxoTE}$  byla zkoumána, ale prozatím nebyla prokázána v kultivovaných buňkách barvínku (Fujioka a kol., 2000). Avšak přirozený výskyt 6-deoxoCT byl zjištěn v kultivovaných buňkách barvínku (Fujioka a kol., 2000), rajčeti (Bishop a kol., 1999) a sazenicích huseníčku (Noguchi a kol., 2000).

Při studii endogenního výskytu 6-deoxoCT v kultivovaných buňkách barvínku byl poprvé zjištěn i výskyt další sloučeniny a to 3-epi-6-deoxocathasteronu (3-epi-6-deoxoCT), u které se vědci domnívají, že by zde mohlo docházet k větvení biosyntetické dráhy brassinosteroidů, která by mohla probíhat přes jinou dráhu než je pozdní a časná C6-oxidační dráha (Fujioka a kol., 2000).

Přirozený výskyt 6-deoxoTE byl potvrzen v kultivovaných buňkách barvínku (Choi a kol., 1997) a huseníčku (Fujioka a kol., 1998). Experimentem s deuteriem značeným 6-deoxoTE bylo zjištěno, že je v kultivovaných buňkách barvínku metabolizován na 6-deoxotyphasterol (6-deoxoTY) a podobně byl metabolizován deuteriem značený 3-dehydro-6-deoxoteasteron (6-deoxo3DT) na 6-deoxoTY (Choi a kol., 1997). Epimerizace 6-deoxoTE na 6-deoxoTY musí probíhat přes 3-oxo formu BR tudíž nejvhodnějším intermediátem se zdá být 6-deoxo3DT (Choi a kol., 1997). Tyto výsledky potvrdil výzkum provedený na huseníčku, který prokázal, že biosyntetická dráha opravdu prochází přes sekvenci kroků  $6\text{-deoxoTE} \rightarrow 6\text{-deoxo3DT} \rightarrow 6\text{-deoxoTY} \rightarrow 6\text{-deoxoCS}$  (Noguchi a kol., 2000).

6-deoxoTY jehož první výskyt byl popsán v pylu cypřiše (*Cupressus arizonica* L.) (Griffiths a kol. 1995) a který se přirozeně vyskytuje v kultivovaných buňkách barvínku (Choi a kol., 1997) je metabolizován na 6-deoxocastasteron (6-deoxoCS), což bylo potvrzeno pomocí výživových experimentů v kultivovaných buňkách barvínku (Choi a kol., 1997). Ve studii zabývající se výskytem 6-deoxoCS v buňkách barvínku byla poprvé zjištěna přeměna 6-deoxoCS na castasteron (CS), která byla současně prokázána i v sazenicích barvínku, rýže a tabáku (Choi a kol., 1996). O několik let později bylo pomocí pokusů s deuteriem značeným 6-deoxoCS a 6 $\alpha$ -hydroxycastasteronem (6-OHCS) prokázáno, že přeměna 6-deoxoCS v kultivovaných buňkách barvínku probíhá přes 6-OHCS na CS

(Fujioka a kol. 2000). Posledním krokem je Baeyerova-Villigerova oxidace CS na brassinolid (BL), která je katalyzována enzymem CYP85A2 u huseníčku (Kim a kol., 2005) a enzymem CYP85A3 u rajčete (Nomura a kol., 2005). Enzymy, které katalyzují jednotlivé kroky biosyntézy brassinosteroidů, byly zjišťovány pomocí mutantů nesousících mutace genů, ovlivňujících biosyntézu brassinosteroidů. Jednotlivé enzymy, které byly zjištěny u huseníčku, jsou zaznamenány v obr. 2. Enzymy vyskytující se u ostatních rostlin jsou popsány v textu zabývajícím se jednotlivými mutanty.

C6-oxidační dráhy jsou dvě převládající biosyntetické dráhy brassinosteroidů. Ale jak můžeme vidět na obr. 2, v dnešní době se už jedná o vzájemně propojenou síť, ke které jsou připojeny další alternativní dráhy biosyntézy brassinosteroidů. To, že se bude jednat o vzájemně propojenou síť, naznačili již Noguchi a kol. (2000), kteří při experimentu na sazenicích huseníčku identifikovali typhasterol jako metabolit 6-deoxoBRs (6-deoxoTE, 6-deoxo3DT a 6-deoxoTY) (Noguchi a kol., 2000). Další popsanou biosyntetickou dráhou BR je například C22-oxidační dráha, která probíhá přes  $22\alpha$ -hydroxycampesterol (22-OHCR)  $\rightarrow$  (22S,24R)-22-hydroxyergost-4-en-3-on (22-OH-4-en-3-on)  $\rightarrow$  (22S,24R)-22-hydroxy-5 $\alpha$ -ergostan-3-on (22-OH-3-on)  $\rightarrow$  3-epi-6-deoxoCT  $\rightarrow$  6-deoxoTY (Fujioka a kol., 2002). Mezi drahami může docházet i k různým zkratkám a jednou z nich je přímá přeměna 22-OH-3-on na 6-deoxo3DT (Ohnishi a kol., 2006).



### 3. Mutanti vyskytující se u huseníčku (*Arabidopsis thaliana* L.)

U huseníčku bylo doposud identifikováno množství genů, které specifickým způsobem ovlivňují přímo biosyntézu brassinosteroidů nebo syntézu sterolů, která ji předchází. Z převážné části byly objeveny pomocí mutantů, kteří nesou mutaci v daném genu. Mutantní rostliny mají specifický fenotyp. Jedná se o rostliny menšího vzrůstu, které mají silnější stonky s menšími listy tmavě zelené barvy. Z biochemického hlediska je jedná o rostliny, u kterých je změněný obsah brassinosteroidů a některé z nich zcela chybí. Morfologické a biochemické změny všech mutantů jsou shrnuty v závěru práce v tab. 1. Mutace genů ovlivňují především syntézu cytochromů P450, což jsou enzymy, které katalyzují biochemické přeměny v biosyntéze brassinosteroidů. Funkce genů jsou objasňovány především nepřímými metodami jako je GC-MS analýza endogenních BR nebo ovlivňování fenotypu mutantů exogenní aplikací BR intermediátů. Mutantní rostliny jsou porovnávány s nemutantními, přirozeně se vyskytujícími rostlinami (divoký typ - wild type, WT). V této práci jsou rostliny divokého typu označovány jako kontrolní rostliny. Přehled začíná mutantem *dwf4*, jenž má mutaci v genu *DWF4*, který ovlivňuje klíčové kroky v biosyntéze BR.

#### 3.1. Mutant huseníčku - *dwarf4* (*dwf4-1*) (viz tab. 1)

Mutantní rostliny *dwf4* se vyznačují značně redukovanou výškou a proto se řadí mezi *dwarf* neboli trpasličí mutanty. Dorůstají průměrné výšky menší než 3 cm, zatímco kontrolní rostliny dorůstají více jak 25 cm. Pozorováním hypokotylů rostlin rostoucích na agaru, bylo zjištěno, že hypokotyly *dwf4* rostlin dosahují konečné délky před pátým dnem růstu, zatímco hypokotyly kontrolních rostlin kontinuálně dále rostou. Projevuje se u nich i další znak typický pro *dwarf* mutanty a to je, že mají kulaté listy tmavě zelené barvy. Tmavě zelená barva je vysvětlena pomocí obsahu chloroplastů v listech. Buňky listového mezofylu u *dwf4* rostlin jsou menší, ale obsahují jen nepatrně menší počet chloroplastů oproti kontrolním rostlinám (40 chloroplastů u *dwf4* a 44 u kontrolních rostlin). Tím, že počet chloroplastů zůstává téměř stejný a velikost buněk se zmenšuje, dochází k vzájemnému přibližování chloroplastů a listy jsou tak tmavší. Listovou růžici *dwf4* rostlin tvoří dvojnásobný počet listů než u kontrolních rostlin, což je vysvětleno prodlouženou fází vegetativního vývoje rostlin (Azpiroz a kol., 1998).

Mikroskopickým pozorováním buněk hypokotylů a stonků květenství se zjistilo, že průměrná velikost buněk u *dwf4* rostlin je značně menší než u kontrolních rostlin, ale nebyl nalezen rozdíl v počtu buněk. Proto se nízký vzrůst a redukováná velikost orgánů u *dwf4* rostlin přisuzuje především tomu, že buňky nejsou schopné se prodloužit (Azpiroz a kol., 1998; Choe a kol., 1998).

Apikální dominance je u *dwf4* mutantů redukována. Mutantní rostliny tvoří třikrát větší počet květenství než kontrolní rostliny a fáze kvetení je u *dwf4* přibližně o 40 dní delší. Kromě celkově redukované velikosti mají *dwf4* mutanti i redukované délky nitek tyčinek. Tyčinky jsou tedy kratší než

gyneceum. Tím, že jsou tyčinky kratší než gyneceum, dochází k ukládání zralého pylu na vnější stěny semeníku místo na bliznu, což má za následek snížení plodnosti *dwf4* mutantů (Azpiroz a kol., 1998).

Pokud jsou mutantní rostliny pěstovány ve tmě, tak mají fenotyp de-etiolizovaných rostlin. Jejich hypokotyly jsou krátké, mají rozvinuté děložní lístky a tvoří listové pupeny. Zatímco kontrolní rostliny pěstované ve tmě mají prodloužené hypokotyly, děložní lístky přitisknuté k sobě a nevytváří listové pupeny (Azpiroz a kol., 1998).

Fenotyp *dwf4* mutantů může být zvrácen k fenotypu kontrolních rostlin exogenní aplikací BR, ale ne jinými hormony (Azpiroz a kol., 1998). Choe a kol. (1998) prováděli pokusy na vyklíčených sazenicích, kterým obohacovali živné médium biosyntetickými intermediáty nebo přímo BL, aby určili přesný krok katalyzovaný pomocí proteinu DWF4. Bylo zjištěno, že pouze 22 $\alpha$ -hydroxylované sloučeniny jako jsou CT, 6-OHCT, 6-deoxoCT, 22-OHCR a intermediáty následující v obou drahách zvrátí fenotyp na světle rostoucí *dwf4* sazenic. Mutantní *dwf4* rostliny mají po aplikaci brassinosteroidů značně prodloužené řapíky děložních lístků, mírně prodloužené hypokotyly, větší nezvlněné listy v porovnání s mutantními rostlinami, na které nebyly aplikovány brassinosteroidy (Choe a kol., 1998).

Za blokový krok u tohoto mutantu je považována 22 $\alpha$ -hydroxylace, ke které za standardních podmínek dochází při metabolické přeměně CN  $\rightarrow$  6-deoxoCT v pozdní C6-oxidační dráze a 6-oxoCN  $\rightarrow$  CT v časně C6-oxidační dráze (Choe a kol., 1998). Tato reakce je katalyzována cytochrom P450 monooxygenasou (CYP90B1), která je kódovaná genem *DWF4* (Choe a kol., 1998; Fujita a kol., 2006). Bylo však zjištěno, že kromě těchto přeměn CYP90B1 katalyzuje i jiné C-22 hydroxylace, které propojují C-22 oxidační dráhu s C-6 oxidačními dráhami, jako je například přeměna CR  $\rightarrow$  22-OH-CR, 4-en-3-on  $\rightarrow$  22-OH-4-en-3-on nebo 3-on  $\rightarrow$  22-OH-3-on. Enzym CYP90B1 katalyzuje reakce propojující biosyntetickou dráhou fytosterolů a brassinosteroidů, což ho staví do pozice klíčového enzymu biosyntézy brassinosteroidů (Fujita a kol., 2006).

Jedná se o protein, který je složený z 513 aminokyselin a je ze 43 % identický s CPD proteinem (CYP90A1). *DWF4* lokus byl definován čtyřmi nezávislými mutantními alelami. *DWF4* gen je tvořen osmi exony a sedmi introny. Mutantní alela *dwf4-1* je výsledkem T-DNA inserce na 5' konci sedmého intronu. Alela *dwf4-2* obsahuje deleci nukleotidů pro tři aminokyseliny a *dwf4-3* obsahuje předčasný stop kodon (v pozici 289), který je způsobený záměnou guaninu za adenin (UGG  $\rightarrow$  UGA) (Choe a kol., 1998).

### 3.2. Mutant huseníčku – *cpd* (*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*) (viz tab. 1)

Neméně důležitým mutantem je i mutant *cpd* izolovaný z T-DNA značené linie huseníčku, jehož fenotyp odpovídá obecné charakteristice BR-deficitních trpasličích mutantů. Ve tmě na rozdíl od kontrolních rostlin vyvíjí krátký hypokotyl, otevřené děložní lístky a listová primordia. S postupem času ve tmě tvoří *cpd* rostliny listovou růžici, zatímco kontrolní rostliny listy nevyvíjejí. Fenotyp mutantních rostlin, které rostou na světle i ve tmě může být zvrácen aplikací BL a jeho C-23

hydroxylovaných prekurzorů jako jsou TE, 3DT, TY a CS. Ale aplikace ostatních fytohormonů (auxinů, giberelinů, cytokininů, kyseliny abscisové a ethylenu) nemá vliv na růst hypokotylů *cpd* rostlin. Mutace u *cpd* rostlin byla způsobena T-DNA inzercí v genu *CPD* a byla lokalizována na chromozomu 5. Sekvenační analýzou se zjistilo, že se *CPD* gen skládá z osmi exonů a kóduje další enzym ze skupiny cytochromů P450 (CYP90) (Szekeres a kol., 1996).

Dlouho se myslelo, že enzym CYP90A1/CPD katalyzuje C-23 hydroxylace (Szerekes a kol., 1996), ale bylo zjištěno, že tuto funkci vykonávají jiné enzymy a to enzymy CYP90C1 a CYP90D1 (Ohnishi a kol., 2006). V nedávné době se zjistilo, že CYP90A1/CPD katalyzuje C-3 oxidace, což je dokládáno výzkumem endogenního obsahu BR v *cpd* rostlinách (Ohnishi a kol., 2012).

Endogenní obsah BR stanovený v *cpd* rostlinách byl porovnán s obsahem BR v kontrolních rostlinách. V obou případech rostliny obsahovaly srovnatelné množství CR a CN, ale *cpd* rostliny obsahovaly redukováný obsah 6-deoxo3DT a 6-deoxoCS a nedetekovatelné množství 6-deoxoTE a 6-deoxoTY. Mutantní rostliny akumulovaly vysoké množství 22-OHCR. Což značí, že ztráta funkce CPD brání C-3 oxidaci 22-OHCR → 22-OH-4-en-3-on nebo C-23 hydroxylaci 22-OHCR → 22,23-diOHCR (Ohnishi a kol., 2012). První z možností se zdá být pravděpodobnější, protože 22,23-diOHCR nebyl prozatím nalezen v žádné zkoumané rostlině (Bajguz a Tretyn, 2003b). V *in vitro* podmínkách se zjistilo, že substráty pro CPD jsou 22-OHCR, 6-deoxoCT, 6-deoxoTE a 22,23-diOHCR, ale největší substrátovou specifitu má 22-OHCR (Ohnishi a kol., 2012).

### 3.3. Mutant huseníčku – *de-etiolated2 (det2)* (viz tab. 1)

Mutant *det2* byl jedním z prvních mutantů, u kterého se zjistilo, že ve tmě projevuje de-etiolizovaný fenotyp. To znamená, že v případě, kdy jsou *det2* rostliny pěstovány ve tmě, je jejich fenotyp podobný *det2* rostlinám pěstovaným na světle. Pro *det2* rostliny pěstované ve tmě je charakteristické, že mají krátké a silné hypokotyly, otevřené děložní lístky a akumulují antokyany. Po delší době růstu ve tmě začnou vytvářet primární listové pupeny. Naopak kontrolní rostliny bez mutace pěstované ve tmě mají dlouhé hypokotyly, nerozvinuté děložní lístky a neakumulují antokyany. Pokud jsou *det2* rostliny pěstovány na světle tak mají menší a tmavší listy než kontrolní rostliny. *det2* rostliny mají prodlouženou vegetativní fázi a tvoří dvakrát větší počet listů než kontrolní rostliny. Mají redukovanou apikální dominanci (Chory a kol., 1991).

Fenotyp rostlin však můžeme být ovlivněn exogenní aplikací BR. Ačkoli exogenní aplikace BR nemá téměř žádný vliv na kontrolní rostliny, tak aplikace CT, TE, 3DT, TY, CS a BL podporuje růst hypokotylů *det2-1* rostlin pěstovaných ve tmě i na světle (Fujioka a kol., 1997). Kromě těchto sloučenin může fenotyp pozitivně ovlivnit i exogenně aplikovaný 22-OH-3-on a 6-deoxoCT (Fujioka a kol., 2002). Sloučeniny jako je CN, 6-OHCN a 6-oxoCN, které neobsahují hydroxylovou skupinu v postranním řetězci, neměly prakticky žádný účinek na *det2-1* rostliny (Fujioka a kol., 1997).

Zastoupení sterolů v *det2* i kontrolních rostlinách je srovnatelné. Nejvíce zastoupeným steroidem je sitosterol, který představuje přibližně 50 % ze všech sterolů obsažených ve zkoumaných



roślinach. Druhým nejvíce zastoupeným steroidem je campesterol (20 %) a třetím cholesterol (10 %). Obsah brassinostereoidů je však v *det2* rostlinách značně redukován. Rostliny *det2* obsahují méně než 10% z množství CS a 6-deoxoCS obsaženého v kontrolních rostlinách. TY a 6-deoxoTY rostliny neobsahují v detekovatelném množství (Fujioka a kol., 1997). V *det2* rostlinách však dochází k akumulaci (24R)-24-methylcholest-4-en-3-onu (Fujioka a kol., 1997) a (22S, 24R)-22-hydroxyergost-4-en-3-onu (Fujioka a kol., 2002). Experimenty s deuteriem značenými intermediáty bylo zjištěno, že blokovanými kroky u *det2* mutantů jsou přeměny 4-en-3-onu → 3-on (Noguchi a kol., 1999) a 22-OH-4-en-3-onu → 22-OH-3-on (Fujioka a kol., 2002). Tyto dráhy byly blokovány i u jiných mutantních rostlin a to u *Pisum sativum* L. (Nomura a kol., 2004) a *Pharbitis nil* L. (Suzuki a kol., 2003).

Za standardních podmínek jsou tyto reakce katalyzovány 5 $\alpha$ -reduktasou, která sdílí přibližně 40% sekvenční identitu se savčí 5 $\alpha$ -reduktasou (Li a kol., 1997). Gen *DET2*, který ji kóduje, je lokalizován na chromozomu 2. Bylo identifikováno pět recesivních alel *det2* a každé z nich byl přiřazen lokus na chromozomu 2. U výše popsaného mutantu *det2-1* dochází k substituci lysinu za kyselinu glutamovou v pozici 204 proteinového řetězce (Chory a kol., 1991).

V nedávné době byl proveden první výzkum, který se týkal čtyř prostorově izomerických a zároveň také nesteroidních mimetik brassinolidu (M21, M44, M56, M59). Jejichž účinek byl porovnáván s účinkem BL na prodloužení hypokotylů a kořenů *d2-1* mutantních rostlin. Ani jedna z látek neměla účinek na prodloužení hypokotylu tak velký jako BL. Největší účinek však měla látka M44, která při koncentraci 10  $\mu$ M způsobila prodloužení hypokotylů sice menší než 0,1  $\mu$ M BL, ale na rozdíl od BL neinhibovala růst kořenů. Zatímco BL při koncentraci 10  $\mu$ M již růst kořenů inhibuje (Kurepin a kol., 2016).

### 3.4. Mutant huseníčku - *dwarf7 (dwf7-1)* (viz tab. 1)

Fenotyp *dwf7-1* rostlin je podobný ostatním výše popsaným mutantům u huseníčku. *Dwf7-1* rostliny mají tmavě zelené kulaté listy, což je dáno tím, že dochází k redukcii délky listů, ale šířka listové čepele zůstává zachována. Výška *dwf7-1* je výrazně redukována. Mutantní rostliny se dorůstají přibližně 4,5 cm a to činí pouhých 14% výšky kontrolních rostlin. Velikost buněk epidermis, primární kůry a xylému je redukována na méně než 30% délky buněk kontrolních rostlin. Pokud rostliny rostou na světle, tak mají krátká robustní květenství a krátké květní stopky. Plodem jsou šešule, které obsahují 4-krát menší počet semen než kontrolní rostliny, čímž je redukována i jejich fertilita (Choe a kol., 1999a). Na rozdíl od *dwf4* (Azpiroz a kol., 1998) nejsou *dwf7-1* rostliny mechanicky sterilní, ačkoli mají v porovnání s kontrolními rostlinami redukovanou délku andrecea i gyneccea (Choe a kol., 1999a).

Organizace a počet cévních svazků ve stonku se u *dwf7-1* mutantních rostlin liší od kontrolních rostlin. Zatímco kontrolní rostliny mají osm pravidelně rozmístěných cévních svazků, u *dwf7-1* je počet cévních svazků redukován na šest a jejich rozmístění je nepravidelné. V rámci

jednoho cévního svazku je u *dwf7-1* rostlin velikost a počet xylémových buněk redukován avšak počet floémových buněk je podobný nebo větší než u kontrolních rostlin (Choe a kol., 1999a).

Mutantní *dwf7-1* rostliny byly využity k pokusům, kdy byly pěstovány v tekutém médiu, které bylo obohaceno brassinolidem. Pokud bylo médium obohaceno brassinolidem, docházelo k elongaci hypokotylů. Hlavní roli v těchto pokusech však hrála koncentrace brassinolidu v médiu. Pokud je koncentrace brassinolidu v rozmezí 10 – 100 nM tak podporuje prodloužení hypokotylů *dwf7-1* rostlin na délku hypokotylů kontrolních rostlin. Vyšší koncentrace (1  $\mu$ M) způsobuje u rostlin inhibici růstu kořenů a jejich hypokotyly jsou pak zbytnělé, zkroucené a křehké (Choe a kol., 1999a). Tento jev byl pozorován například i u rýže (Mori a kol., 2002).

Pro zjištění chybného kroku v biosyntéze brassinosteroidů u *dwf7-1* bylo využito experimentů s exogenně aplikovanými sloučeninami: 22-OHCR, 6-deoxoCT a BL. Všechny tři testované sloučeniny způsobily prodloužení květních stopek o více než 200 % vzhledem k WT. Což naznačovalo, že defektním krokem je buď přímo přeměna 24-MC  $\rightarrow$  CR nebo že se defektní krok nachází v syntéze sterolů (Choe a kol., 1999a).

GC-MS analýzou endogenního obsahu brassinosteroidů se zjistilo, že hladiny sterolů (24-MC, CR a CN) byly u tohoto mutanta sníženy na 1-3 % obsahu změřeného u kontrolních rostlin, z čehož se usuzovalo, že chybný krok se nachází už před syntézou 24-MC. Pomocí  $^{13}\text{C}$ -značené mevalonové kyseliny (MVA) a kompaktinu (inhibitor biosyntézy MVA) bylo zjištěno, že poškozeným biosyntetickým krokem je C-5 desaturační krok. To znamená, že je blokována přeměna episterolu  $\rightarrow$  5-dehydroepisterol a nedochází tak k tvorbě dvojné vazby mezi pátým a šestým uhlíkem. Protože v kontrolních rostlinách byla zjištěna přítomnost značených metabolitů MVA  $^{13}\text{C}_5$ -episterolu,  $^{13}\text{C}_5$ -24-MC a  $^{13}\text{C}_5$ -CR. Zatímco v mutantních *dwf7-1* rostlinách nebyl detekován  $^{13}\text{C}_5$ -5-dehydroepisterol ani žádné intermediáty následující v biosyntetické dráze po 5-dehydroepisterolu. V mutantních rostlinách však dochází k akumulaci  $^{13}\text{C}_5$ -episterolu a  $^{13}\text{C}_5$ -7-dehydrocampestanolu (24-epifungisterolu) (Choe a kol., 1999a).

Mutant *dwf7-1* byl původně identifikován v transgenní linii huseníčku, ve které byla jako mutagen použita T-DNA. Alela *dwf7-1* byla lokalizována na choromozomu 3 v blízkosti SSLP markeru *nga172*. Posléze bylo zjištěno, že *dwf7-1* je alela genu *STEROLI* (*STE1*). Sekvenováním *STE1* v *dwf7-1* mutantu se zjistilo, že dochází k substituci guaninu za adenin a místo tryptofanu (TGG) dochází k tvorbě předčasného stop kodónu (TAG) ve třetím exonu bezprostředně před třetím histidinovým boxem. Mutací způsobený úbytek sterolů a tím pádem i brassinosteroidů vede k výše popsanému fenotypu (Choe a kol., 1999a).

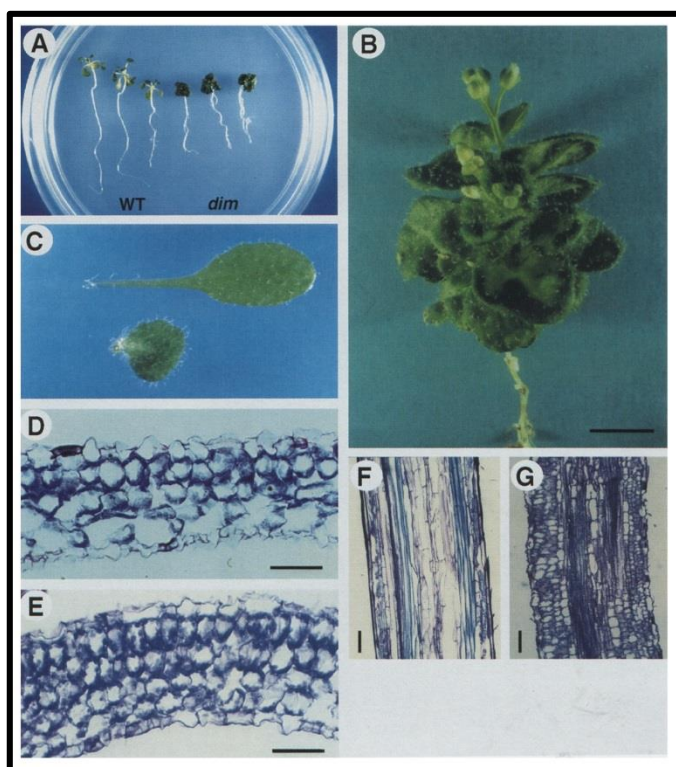
### 3.5. Mutant huseníčku – *dwarf1* (viz tab. 1)

Mutant *dwf1* byl původně izolován z T-DNA značené linie huseníčku a byl identifikován podle nízkého vzrůstu, tmavě zelených listů a robustního stonku. Jeho fenotyp nemohl být zvrácen fytohormony podporující růst, jako jsou auxin a giberelin ( $\text{GA}_3$ ) (Feldmann a kol., 1989). Postupem

času bylo izolováno několik dalších mutantních alel *dwf1*. Takahashi a kol. (1995) izolovali morfolologicky podobného mutantu, kterého označili jako *diminuto* (*dim*). Později byl *dim* přejmenován na *dwf1-2* (Klahre a kol., 1998). O rok později Kauschmann a kol. (1996) izolovali alelu *dwf1-6* (*cbb1*) z T-DNA linie. Další popsanou alelou je například *dwf1-1* (Choe a kol., 1999b).

### 3.6. Mutant huseníčku – *dwf1-2* (*dim*) (viz tab. 1)

Mutant označený jako *dim* byl izolován z transgenní linie huseníčku., která byla vytvořena inzercí T-DNA do genomu rostlin (Takahashi a kol., 1995). Morfolologicky se jedná o typického trpasličího mutantu, který má krátké hypokotyly a redukovanou délku kořenů (obr. 3A). Jeho listy jsou kulaté, zvlněné, tmavě zelené a ke stonku je poji krátké řapíky (obr. 3B, C). Menší velikost listů je dána tím, že buňky jsou redukovány v podélné ose orgánů (obr. 3G). Naproti tomu v dospělých listech *dim* rostlin jsou mezofylové buňky rozšířené v dorzoventrální ose listů a tím dochází k jejich tloušťnutí (obr. 3E). Tmavší barva listů *dim* rostlin je přičítána zvýšené hustotě chloroplastů na povrch listu. Je to dáno tím, že buňky se zmenšují, ale počet chloroplastů je podobný jako u kontrolních rostlin. Poměr chlorofylů *a/b* zjištěný u mutantních rostlin byl téměř stejný jako u kontrolních rostlin. Mutantní rostliny mají extrémně krátká květenství s malými květy (Takahashi a kol., 1995).



**Obr. 3: Fenotyp *dim* rostlin a kontrolních rostlin pěstovaných na světle.**

**A** – celková morfologie 10 dní starých rostlin - vlevo kontrolní a vpravo *dim* rostliny; **B** - 30 dní stará *dim* rostlina (pruh = 10 mm); **C** - morfologie listu: horní list kontrola, dolní list *dim*; **D** a **E** - podélný řez prvním pravým listem: kontrola (**D**), *dim* (**E**); **F** a **G** – podélný řez bazálním internodiem květenství: kontrola (**F**), *dim* (**G**)

(převzato z Takahashi a kol., 1995)

*Dim* rostliny pěstované ve tmě nevytváří apikální háčky a mají krátké hypokotyly, otevřené děložní lístky a vytváří primární listové pupeny. Naproti tomu kontrolní rostliny mají prodloužené hypokotyly s uzavřenými děložními lístky. Z toho vyplývá, že u *dim* mutantu se projevuje detiolizovaný fenotyp (Takahashi a kol., 1995).

Mutantní fenotyp *dim* rostlin může být zvrácen exogenní aplikací BL a jeho prekurzorů TE, TY a CS. Čím více jsou prekurzory vzdáleny v biosyntetické dráze od BL, tím jejich účinek klesá. Analýzou endogenního obsahu BR bylo zjištěno, že *dim* mutant akumuluje 24-methylencholesterol (24-MC) a isofucosterol, zatímco obsah campesterolu a sitosterolu je značně snížený. Tyto výsledky naznačují, že *dim* mutant má poruchu v metabolismu 24-MC → CR a isofucosterolu → sitosterol. Pomocí pokusů s deuteriem značeným 24-methylencholesterolem byla tato skutečnost potvrzena, protože *dim* mutant nebyl schopen přeměnit deuteriem značený 24-methylencholesterol na campesterol. Brassinosteroidy jako jsou CS, TY a 6-deoxoTE nebyly u mutantních rostlin přítomny v detekovatelném množství (Klahre a kol., 1998).

*DIM* gen, který obsahuje pouze jeden intron, byl lokalizován na chromozomu 3. T-DNA byla v tomto případě mutagenem a její inserce u *dim* mutanta narušila první exon genu (Takahashi a kol., 1995). Gen *DIM* kóduje protein DIM/DWF1 čítající 561 aminokyselin, který je zapojen v izomeraci a redukci  $\Delta^{24(28)}$  dvojné vazby výše zmíněných 24-MC a isofucosterolu (Klahre a kol., 1998). Analýzou RNA z různých orgánů rostliny bylo odhaleno, že *DIM* gen je konstitutivně exprimován ve všech zkoumaných orgánech – kořenech, listech, květenstvích, květech a šišulích. Kromě toho bylo zjištěno, že *dim* mutant má sníženou expresi genu  $\beta$ -tubulinu (*TUB1*), který je důležitý pro růst buněk (Takahashi a kol., 1995).

### 3.7. Mutant huseníčku - *dwf5* (viz tab. 1)

Stejně jako u předešlých mutantů se i mutant *dwf5* vyznačuje nízkým robustním vzrůstem, krátkými internodii a tmavě zelenými kulatými listy. Výška rostlin se pohybuje v rozmezí 22-53% výšky kontrolních rostlin v závislosti na tom o jakou *dwf5* alelu se jedná. Mutantní rostliny mají redukovanou i délku řapíků, květních stopek a šišulí. Tvoří však větší množství květenství. Exogenní aplikací 6-deoxoCT a BL lze fenotyp zvrátit k fenotypu kontrolních rostlin. Rostliny mají redukované množství 24-MC, CR a CN. Pomocí značené MVA se zjistilo, že blokováným krokem je přeměna 5-dehydroepisterolu na 24-methylencholesterol. Při této přeměně za stanradních podmínek dochází k redukci dvojné vazby mezi sedmým a osmým uhlíkem. *DWF5* gen jehož mutace způsobují výše zmíněný fenotyp je složen z 13 exonů a 12 intronů (Choe a kol., 2000).

## 4. Mutanti vyskytující se u rajčete (*Solanum lycopersicum* L.)

### 4.1. Mutant rajčete – *dumpy* (*dpy*) (viz tab. 1)

*Dumpy* je přirozeně se vyskytující mutant, který má recesivní mutaci *dpy*. Jeho charakteristickým znakem jsou tmavě zelené zkroucené listy, které jsou podtočené směrem dolů. Mutantní rostliny jsou menšího vzrůstu než kontrolní rostliny a mají redukované postranní větvení stonku. Vzhled listů lze ovlivnit aplikací BL, avšak pokud se přestane BL na rostlinu aplikovat, tak nově vyvinuté listy budou mít fenotyp *dpy*. Výrazný vliv na fenotyp listů má i aplikace intermediátů

pozdní C6-oxidační dráhy (6-deoxoTE, 6-deoxo3DT, 6-deoxoTY a 6-deoxoCT), ale jejich vliv na výšku rostlin není tak výrazný, jako u CS a BL. Aplikace GA<sub>3</sub> na *dpy* způsobí prodloužení internodií, ale neovlivňuje fenotyp listů. Pokud jsou rostliny pěstovány ve tmě, mají krátký a silný hypokotyl velikostně podobný rostlinám pěstovaným na světle, ale zachoval se u nich výrazný apikální háček a uzavřené děložní lístky, což nekoresponduje s fenotypem de-etiolizovaných rostlin u huseníčku (Koka a kol., 2000).

Rozdíl mezi odpověďmi na exogenní podání 6-deoxoTE a 6-deoxoCT byl značný a naznačovat, že blokováním krokem by mohla být právě přeměna 6-deoxoCT → 6-deoxoTE. Což bylo potvrzeno tím, že *dpy* obsahuje dvakrát větší množství 6-deoxoCT a o polovinu menší množství 6-deoxoTE než obsahovaly kontrolní rostliny (Koka a kol., 2000).

#### 4.2. Mutant rajčete – *extreme dwarf* (*d<sup>x</sup>*) (viz tab. 1)

Fenotyp *d<sup>x</sup>* rostlin je podobný mutantům huseníčku. Což znamená, že rostliny mají krátký hypokotyl, postrádají apikální háček a mají nízký vzrůst. Fenotyp mutantních rostlin lze částečně ovlivnit exogenní aplikací BL, jak u rostlin pěstovaných na světle tak u rostlin pěstovaných ve tmě. BL však způsobuje inhibici prodlužování kořenů rostlin. Mutantní rostliny *d<sup>x</sup>* nemají redukovanou apikální dominanci (Bishop a kol., 1999).

Největší odpověď mají rostliny na exogenně aplikované intermediáty BR časně C6-oxidační dráhy, které obsahují karbonylovou skupinu na šestém uhlíku. Odpověď koreluje s pozicí intermediátu v biosyntetické dráze, čím je intermediát vzdálenější od BL, tím je jeho vliv na rostliny nižší. Zatímco 6-deoxo intermediáty pozdní C6-oxidační dráhy, například 6-deoxoCS vyvolal menší odpověď než CS. Analýzou endogenního obsahu brassinosteroidů bylo zjištěno, že mutantní *d<sup>x</sup>* neobsahuje CS, ale že akumuluje 6-deoxoCS, který je obsažen ve čtyřnásobném množství v povnání s nemutantními rostlinami (Bishop a kol., 1999). Což značí, že gen *DWARF*, který kóduje enzym cytochrom P450 (CYP85A1) (Bishop a kol., 1996), hraje roli v C6-oxidaci 6-deoxoCS → CS (Bishop a kol., 1999).

### 5. Mutanti vyskytující se u hrachu (*Pisum sativum* L.)

#### 5.1. Mutant hrachu – *lkb* (viz tab. 1)

*Lkb* mutant je jedním z *dwarf* mutantů nalezených u hrachu. *Lkb* mutantní rostliny mají celkově menší vzrůst než kontrolní rostliny. Z čehož vyplývá, že pro *lkb* mutantní rostliny je charakteristickým znakem redukováná délka internodií, silnější stonek a tmavě zelené epinastické listy (Nomura a kol., 1997; Schultz a kol., 2001).

Jedná se o BR-deficitního mutantu, jehož fenotyp může být zvrácen exogenní aplikací BL a jeho prekurzorů CS, TY, 3DT a TE (Nomura a kol., 1997,1999). Aplikace těchto látek na třetí list *lkb* rostlin způsobí nárůst délky čtvrtého a pátého internodia. Avšak aplikovaný 6-deoxoCS je neaktivní

(Nomura a kol., 1997). Takto brassinolidem a jeho prekurzory indukovaná elongace internodií však není způsobena nárůstem počtu buněk, ale větším prodloužením buněk (Nomura a kol., 1997).

Podobně jako při objasňování biosyntézy brassinosteroidů u předchozích druhů i zde byl analyzován endogenní výskyt brassinosteroidů u *lkb* a kontrolních rostlin pomocí metody GC-MS (Nomura a kol., 1997). Snižovaný obsah brassinosteroidů byl pozorován u různě starých rostlin hrachu. Například porovnáním *lkb* mutantních rostlin a kontrolních rostlin bylo zjištěno, že výhonky 36 dní starých *lkb* mutantních rostlin obsahují 23-krát méně BL, 22-krát méně CS a 9-krát méně 6-deoxoCS než kontrolní rostliny (Nomura a kol., 1997). Ve vrcholcích čtvrtých internodií 6 měsíců starých *lkb* mutantních rostlin bylo obsaženo 2,4 - krát méně BL, 39-krát méně CS a 9-krát méně TY než u stejně starých kontrolních rostlin (Nomura a kol., 1997). Z porovnání hodnot hladin exogenních brassinosteroidů vyskytujících se v nadzemních částech 36 dní starých *lkb* mutantech a ve čtvrtých internodiích 6 měsíců starých rostlin vyplývá, že ve vrcholech čtvrtých internodií *lkb* rostlin jsou obsaženy mnohem vyšší hladiny BL a CS než jsou obsaženy v nadzemních částech 36 dní starých *lkb* rostlin (Nomura a kol., 1997). Z těchto výsledků by se dalo soudit, že mladší rostlinné tkáně obsahují vyšší hladiny brassinosteroidů.

O dva roky později zveřejnili Nomura a kol. (1999) další výsledky týkající se *lkb* mutantů hrachu. V tomto případě byl výzkum prováděn na 49 dní starých *lkb* mutantních rostlinách. Bylo zjištěno, že mutantní *lkb* rostliny obsahují z 6-oxoBRs pouze 23% CS a 15% TY a z 6-deoxo-BRs rostliny obsahují 7% 6-deoxoCS a 29% 6-deoxoTY z množství BR obsaženého v kontrolních rostlinách (Nomura a kol., 1999).

GC-MS analýza endogenních sterolů v *lkb* mutantních rostlinách ukázala, že *lkb* mutantní akumulují 24-MC, ale mají deficit v jeho hydrogenovaném produktu – CR, což naznačuje, že *LKB* gen kontroluje přeměnu 24-MC → CR v biosyntetické dráze brassinosteroidů (Nomura a kol., 1997, 1999). Což v konečné fázi vede k nedostatku biologicky aktivního BL (Schultz a kol., 2001).

U *lkb* rostlin je pozorována i změna ve stavbě mikrozomálních membrán, kdy kontrolní rostliny obsahují jako hlavní steroly sitosterol a stigmasterol, zatímco *lkb* rostliny obsahují isofucosterol a stigmasterol (Nomura a kol., 1999).

Schultz a kol. v roce 2001 informovali o tom, že *LKB* gen hrachu je homologem *DIMINUTO/DWARF-1* (*DIM/DWFI*) genu vyskytujícího se u huseníčku (Klahre a spol., 1998). *DIM/DWFI* homolog u *lkb* rostlin hrachu obsahuje mutaci ve struktuře genu, u které se předpokládá, že je příčinou redukováné hladiny brassinosteroidů v *lkb* rostlinách. Mutace vyskytující se u *lkb* mutantu byla nalezena v bázi 128. Jedná se o bodovou mutaci, při které dochází k substituci guaninu za adenin, což má za následek změnu aminokyseliny argininu (Arg) na lysin (Lys) v pozici 24. Zachování umístění argininu v pozici 24 bylo pozorováno napříč všemi druhy od lidí až po hrách, což naznačuje důležitou roli ve funkci proteinu (Schultz a kol., 2001).

## 5.2. Mutant hrachu – *lk* (viz tab. 1)

Dalším mutantem vyskytujícím se u hrachu je *lk* mutant, který byl objeven použitím alelických testů spolu s mutanty *lh* a *ls* (Reid 1986). Fenotyp *lk* mutanta je charakterizován: krátkými internodii, redukovanou plodností, tmavě zelenými listy, křehkými lámavými stonky, krátkými řapíky a zvýšenou apikální dominancí (Reid 1986). Hrách patří mezi bobovité rostliny (*Fabaceae*), jejichž symbióza s hlízkovými bakteriemi rodu *Rhizobium* byla zkoumána i na BR biosyntetických mutantech a to na *lk* a *lkb* a výsledky byly porovnávány s kontrolními rostlinami cv. Torsdag. Bylo zjištěno, že *lk* a *lkb* mutanti mají méně laterálních kořenů, které jsou kratší než u kontrolních rostlin a zároveň mají redukováný počet hlízek (Ferguson a kol., 2005).

Exogenní aplikací BL na čtvrté internodium *lk* mutanta je možné ovlivnit jeho růst a navrátit ho k velikosti kontrolních rostlin. Všechny koncentrace BL však nemají stejný pozitivní efekt na růst *lk* rostlin. Pozitivní efekt má na rostliny pouze BL o nízké koncentraci, pokud se koncentrace aplikovaného BL zvyšuje, dochází k tomu, že čtvrté internodium začne tloustnout, kroutit se a řapíky začnou být epinastické (Nomura a kol., 2004).

Jedná se o BR-deficientního mutanta, který obsahuje redukované množství CS, 6-deoxoCS a 6-deoxoTY (Nomura a kol., 2004). Pro zjištění, které syntetické kroky jsou ovlivněny u *lk* mutantů, se využilo deuteriem značených sloučenin, jako jsou CR, campest-4-en-3 $\beta$ -ol, campest-4-en-3-on a 5 $\alpha$ -campestan-3-on, kterými byly ošetřeny apikální tkáň *lk* a kontrolních rostlin (Nomura a kol., 2004). Pomocí kontrolních rostlin bylo ověřeno, že všechny zmíněné deuteriem značené sloučeniny byly metabolizovány na campestanol a tím se potvrdila i biosyntetická dráha campesterol  $\rightarrow$  campest-4-en-3 $\beta$ -ol  $\rightarrow$  campest-4-en-3-on  $\rightarrow$  5 $\alpha$ -campestan-3-on  $\rightarrow$  campestanol u hrachu. U *lk* mutantních rostlin bylo zjištěno, že [ $^2\text{H}_6$ ]campesterol a [ $^2\text{H}_6$ ]campest-4-en-3 $\beta$ -ol byly metabolizovány na campest-4-en-3-on, nicméně [ $^2\text{H}_6$ ]campest-4-en-3-on nebyl dále metabolizován, zatímco [ $^2\text{H}_6$ ] 5 $\alpha$ -campestan-3-on byl metabolizován na campestanol. Z těchto výsledků je patrné, že *lk* mutace blokuje přeměnu 4-en-3-onu  $\rightarrow$  3-on, což je klíčový hydrogenační krok v syntéze CN z CR (Nomura a kol., 2004). A tyto výsledky ukazují na to, že *LK* gen kóduje 5 $\alpha$ -reduktasu (Nomura a kol., 2004).

Stejně jako u *lkb* mutanta se i zde u *lk* mutanta jedná o bodovou mutaci DNA v bázi 437. V řetězci dochází k substituci guaninu za adenin, což má za následek, že aminokyselina tryptofan je zaměněna za stop kodon v pozici 146. To má za následek zkrácení proteinu a ztrátu funkce LK proteinu. Tím dochází k blokaci biosyntézy brassinosteroidů v časně fázi, která způsobuje deficit biologicky aktivních brassinosteroidů, čímž se vysvětluje extrémní fenotyp *lk* mutantů (Nomura a kol., 2004).

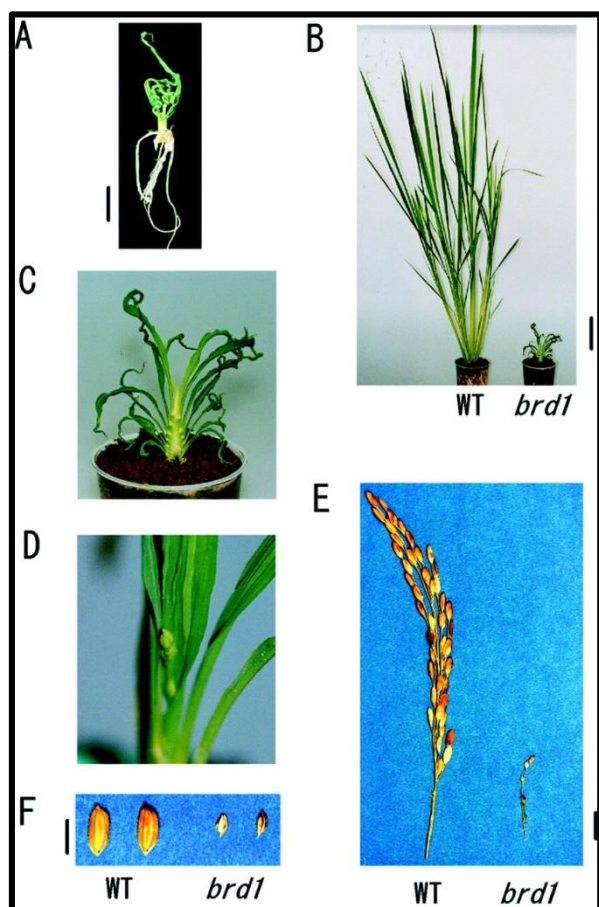
## 6. Mutanti vyskytující se u rýže (*Oryza sativa* L.)

Rýže je jedna z mála plodin, u které byla zkoumána biosyntéza brassinosteroidů. Bylo identifikováno několik mutantů, kteří mají poruchu v jejich syntéze. Patří mezi ně *brd1* (Hong a kol., 2002; Mori a kol., 2002), *brd2* (Hong a kol., 2005), *d2* (Hong a kol., 2003) a *d11* (Tanabe a kol., 2005).

### 6.1. Mutant rýže (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) - *brd1* (viz tab. 1)

Mutantní rostliny *brd1* (*brassinosteroid-dependent 1*) jsou charakterizovány krátkými zkroucenými listovými čepelemi (Obr. 5A) a krátkými listovými pochvami (Mori a kol., 2002). Jak je

vidět na obr. 5B jedná se opravdu o velmi malé rostliny. Celková výška *brd1* rostlin je přibližně 10-krát menší než jaké dorůstají kontrolní rostliny bez mutace (Hong a kol., 2002). Tvoří méně odnoží než kontrolní rostliny. Laty vytváří pouze v ojedinělých případech, potom jsou krátké a pouze s několika malými a sterilními obilkami, které nemají vyvinutý semenný bílek (albumen) (Mori a kol., 2002).



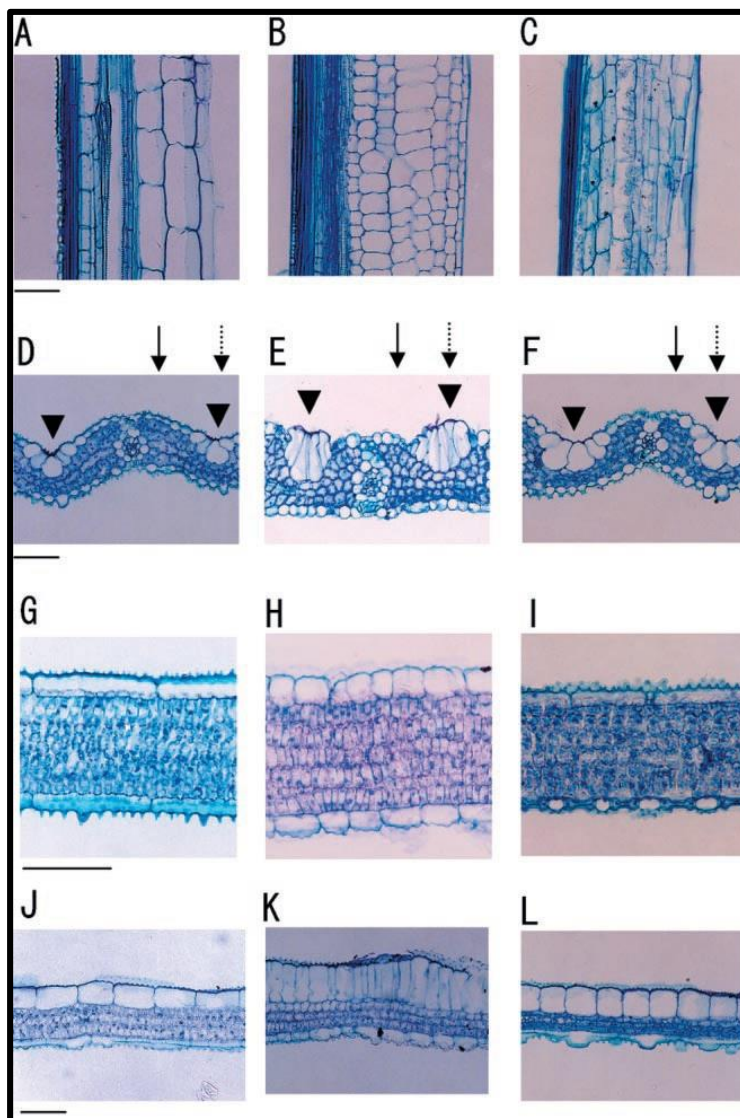
**Obr. 5: Morfologie *brd1* mutantních rostlin.**

A – 3 týdny stará *brd1* rostlina (proužek = 1 cm), B – 80 dní stará kontrolní rostlina (WT) a *brd1* mutantní rostliny (proužek = 10 cm), C – detailní pohled na *brd1* z obrázku B, D – 6 měsíců stará *brd1* rostlina s krátkou latou, E – laty (proužek = 1 cm), F – obilky (převzato z Mori a kol., 2002)

Kromě morfologických změn nadzemní části dochází i ke změnám podzemní části. Kořeny mutantních rostlin jsou výrazně kratší, ale tvorba laterálních kořenů není zasažena (Hong a kol., 2002). Buňky listových pochev jsou u mutantních rostlin *brd1* v podélném směru redukovány o více než 75 %, což vysvětluje redukovanou délku pochev. V dorzoventrální ose jsou epidermální buňky větší a listy jsou tedy silnější než u kontrolních rostlin (Obr. 6B). Mutantní rostliny mají v listech vyvinuté větší ohýbací buňky (Obr. 6E), které hrají roli při svinování listové čepele a v tomto případě pravděpodobně způsobují zkroucení listových čepelí mutantů *brd1*. Buňky listového mezofylu mutantních rostlin jsou u sebe blíže (Obr. 6H), takže jsou mezi nimi menší mezibuněčné prostory než



u kontrolních rostlin bez mutace. Všechny tyto znaky byly zvráceny k fenotypu rostlin bez mutace přidáním 40 nM BL do živného média (Obr. 6 C, F, I, L) (Mori a kol., 20002). U *brd1* rostlin, které byly pěstovány ve tmě, se projevila konstitutivní fotomorfogeneze (Mori a kol., 2002).



**Obr. 6: Podélné a příčné řezy listy mutantních rostlin *brd1*, rostlin bez mutace a mutantních *brd1* rostlin po ošetření 40 nM BL.**

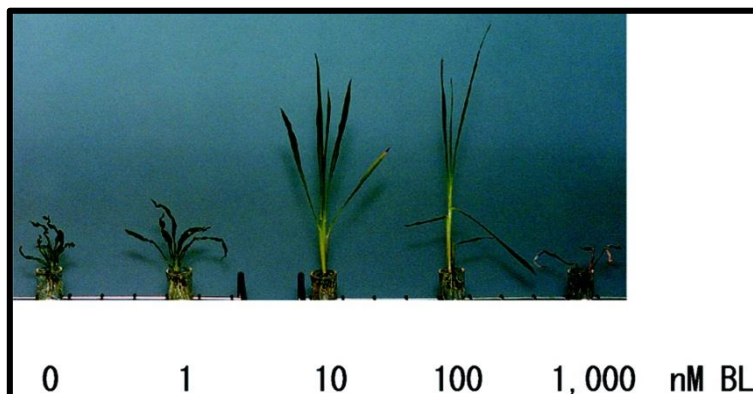
**A-C:** Podélný řez listové pochvy osmého listu rostliny bez mutace (A), *brd1* (B) a *brd1* v přítomnosti 40 nM BL (C).

**D-E:** Příčný řez listové čepele osmého listu rostliny bez mutace (D), *brd1* (E) a *brd1* v přítomnosti 40 nM BL (F).

Podélný řez listové čepele  
**G a J** – rostliny bez mutace  
**H a K** – *brd1*  
**I a L** – a *brd1* v přítomnosti 40 nM BL  
 plná šipka značí místo řezu G-I,  
 přerušovaná šipka značí místo řezu J-L,  
 trojúhelníky značí ohýbací buňky

(převzato z Mori a kol., 2002)

Mutantní fenotyp *brd1* rostlin lze zvrátit exogenním podáním brassinosteroidů. Testován byl především účinek BL, který byl přidáván do živného roztoku v rozmezí koncentrací 0 – 1000 nM BL. Fenotyp rostlin je zobrazen na obr. 7, na kterém můžeme vidět, že největšího účinku bylo docíleno u rostlin, které rostly v živném roztoku obsahujícím 10 a 100 nM BL. Listové pochvy byly nepatrně delší u mutantu rostoucího v živném roztoku obsahující 10 nM BL v porovnání s mutantem rostoucím v živném roztoku obsahující 100 nM BL. U rostlin, které rostly v roztoku o vyšší koncentraci BL (100 nM BL), docházelo k ohýbání vývojově starších listů. Nejkoncentrovanější živný roztok (1000 nM BL) zhoršil růstové schopnosti rostlin (Mori a kol., 2002).



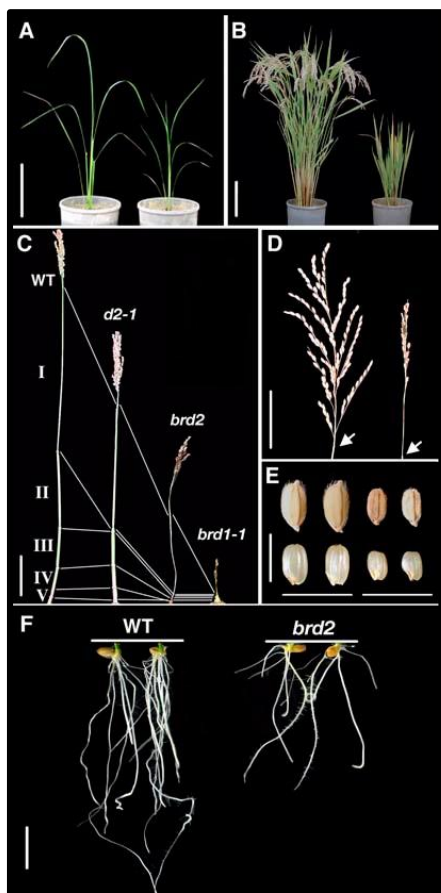
**Obr. 7: Morfologie *brd1* rostlin po přidání BL do živného roztoku (převzato z Mori a kol., 2002).**

Kvantitativní analýzou za použití metody GC-MS bylo zjištěno, že mutantní *brd1* rostliny obsahují vyšší množství 6-deoxoCS, 6-deoxo3DT, 6-deoxoTY a menší množství CS, TY a TE v porovnání s množstvím obsaženým v kontrolních rostlinách bez mutace (Mori a kol., 2002; Hong a kol., 2002). BL nebyl detekován v mutantních ani kontrolních rostlinách. To, že *brd1* rostliny obsahují zvýšené množství 6-deoxo brassinosteroidů a snížené množství 6-oxo brassinosteroidů, naznačuje, že *BRD1* gen kóduje enzym BR C-6-oxidasu (Mori a kol., 2002; Hong a kol., 2002).

Jelikož *DWARF* gen kóduje BR C-6-oxidasu v rajčeti, rozhodli se autoři nalézt podobný gen u rýže. Nakonec identifikovali *OsDWARF* gen, který mu byl nejpodobnější. Gen je tvořený devíti exony a osmi introny. Mutace *brd1* byla lokalizována na dlouhém raménku chromozomu 3. Alela *brd1* má vymazanou sekvenci 113 nukleotidů od 5' konce šestého intronu až po 5' konec sedmého exonu. Dochází k tvorbě předčasného stop kodonu a zkrácení proteinu o doménu vázající hem. *OsDWARF* gen kóduje protein patřící do skupiny cytochromů P450 (CYP85A1). Pokud je *OsDWARF* gen zaveden do mutantní rostliny, tak dojde ke zvrácení mutantního fenotypu (Hong a kol., 2002).

## **6.2. Mutant rýže (*Oryza Sativa* L. cv. Nipponbare) – *dwarf2* (*brd2*) (viz tab. 1)**

Mutant *brd2* patří do skupiny mutantů, kteří jsou BR deficitní. Nedostatek brassinosteroidů u něj způsobuje typický fenotyp: redukováná výška rostliny (70% výšky kontrolních rostlin, obr. 8A), tmavě zelené vzpřímené listy a zkrácené listové pochvy (Hong a kol., 2005). Redukovaná délka listových pochev, byla charakteristická i pro jiného mutantu rýže a to *brd1* (Mori a kol., 2002). Po fázi kvetení však mutantní rostliny dosahují už pouze 40% výšky kontrolních rostlin (Obr. 8B). Na obrázku 8C můžeme pozorovat rozdíly v prodlužování internodií tří mutantů rýže oproti nemutantní kontrolní rostlině. Mutant *brd1* má celkově redukovanou stavbu těla, u *brd2* se prodlužuje především internodium označené v obr. 8C jako (I) a mutant *d2* má inhibovaný růst internodia (II). *Brd2* mutant produkuje čtyřikrát menší počet obilek, které mají menší velikost než obilky kontrolních rostlin (Obr. 8E). Má výrazně kratší a chudší kořenový systém (Hong a kol., 2005).



**Obr. 8: Fenotyp *brd2* mutanta:**

**A** – celkový vzhled kontrolní (vlevo) a mutantní rostliny (vpravo)

**B** – celkový vzhled rostlin ve fázi kvetení; kontrolní (vlevo) a mutantní rostliny (vpravo)

**C** – porovnání elongace internodií *brd2* s dalším BR deficitními mutanty

**D** – struktura laty kontrolní (vlevo) a mutantní rostliny (vpravo)

**E** – morfologie obilek kontrolní (vlevo) a mutantní rostliny (vpravo)

**F** – morfologie kořenového systému

(Převzato z Hong a kol., 2005)

Lokus *brd2* byl lokalizován na chromozomu 10. Jedná se o gen, který je homologní ke genu *DIM/DWF1* u huseníčku. Obsahuje tři exony a dva introny. Ve druhém exonu dochází u *brd2* mutanta k deleci guaninové báze, což vede k posunu čtecího rámce a vytvoření předčasného stop kodonu v blízkosti delece. Mutace způsobuje ztrátu většiny FAD vazebné domény. Zavedením nemutovaného genu *DIM/DWF1* do *brd2* dojde k zvrácení fenotypu k fenotypu kontrolních rostlin (Hong a kol., 2005).

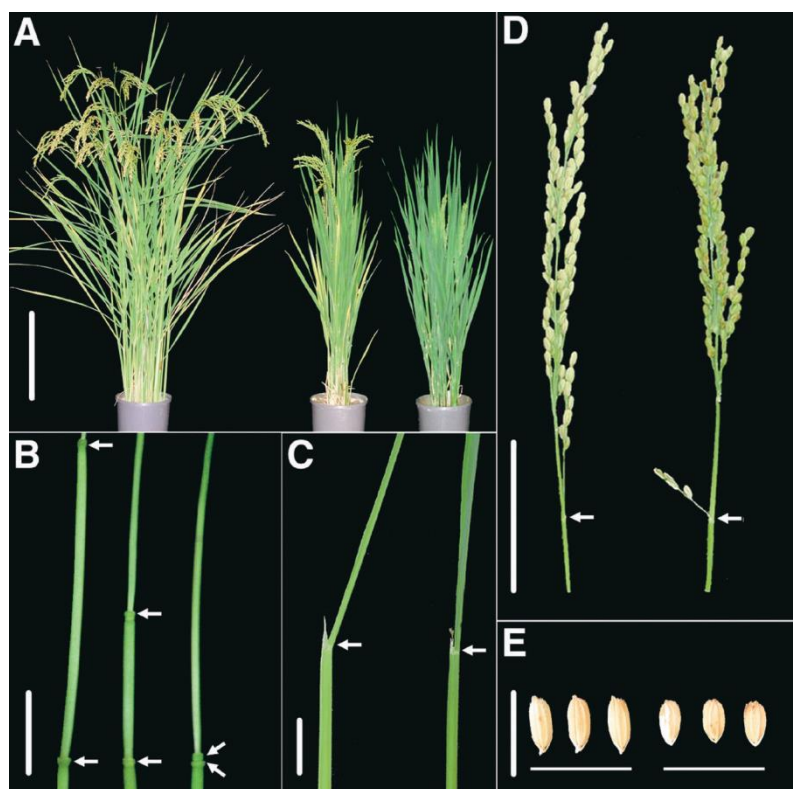
Kvantitativní analýzou bylo zjištěno, že *brd2* mutant akumuluje 24-MC ve více než 10-násobném množství oproti kontrolním rostlinám. Obsah ostatních intermediátů biosyntézy od campesterolu ke castasteronu byl značně redukován, v případě campesterolu více než 100-krát. To znamená, že blokováním krokem je přeměna 24-MC → CR stejně jako tomu je u *dim* mutanta huseníčku. Ačkoli *DIM/DWF1* protein katalyzuje u huseníčku i u rýže stejný krok BR biosyntetické dráhy, tak závažnost vyřazení genu *DIM/DWF1* se značně liší (Hong a kol., 2005) a více se projevuje na fenotypu *dim* mutantních rostlin huseníčku (Takahashi a kol., 1995).

Vědci se snažili zjistit, proč u *brd2* dochází k menšímu ovlivnění fenotypu. Protože nebyl objeven žádný další homolog *DIM/DWF1*, který by mohl být obsažen v genomu rýže, došli k závěru, že v rýži pravděpodobně probíhá alternativní biosyntetická dráha brassinosteroidů. A nejpravděpodobnější se zdá být syntéza bioaktivních BR přes 24-methylen-intermediáty, protože

jejich obsah v *brd2* byl výrazně zvýšen a konečný produkt této dráhy dolichosteron byl obsažen v *brd2* na rozdíl od kontrolních rostlin a pravděpodobně zmírňuje účinky mutace (Hong a kol., 2005).

### 6.3. Mutant rýže – *ebisu dwarf* (*d2*) (viz tab. 1)

U toho mutanta byly nalezeny dvě alely, každá z nich má jiný vliv na fenotyp rostlin. Jsou označeny jako *d2-1* a *d2-2*. U obou typů dochází k redukci výšky, kdy *d2-1* dosahuje přibližně 70% a *d2-2* přibližně 80% výšky kontrolní nemutované rostliny (Obr. 9A). Zasažený je především růst druhého internodia. U *d2-1* rostlin dochází k jeho kompletní redukci, zatímco u *d2-2* je redukován na polovinu délky druhého internodia kontrolních rostlin (Obr. 9B). Listy mutantních rostlin jsou vzpřímené na rozdíl od kontrolních rostlin, které mají listové čepele vychýlené z vertikální osy stonku (obr. 9C). Mutantní rostliny tvoří kratší obilky než je tomu u kontrolních rostlin (obr. 9E) (Hong a kol., 2003).



**Obr. 9: Morfologické znaky *d2* mutanta.**

(A) Celková morfológická stavba kontrolní rostliny (vlevo), *d2-2* (uprostřed) a *d2-1* (vpravo). Proužek = 20 cm. (B) Prodloužení druhého internodia, které je značně redukováné u *d2-1* (vpravo), redukováné přibližně na polovinu u *d2-2* (uprostřed) a kontrolní (vlevo). Šipky označují pozici nodů. Proužek = 5 cm. (C) Morfologie listu. Listová čepel kontrolní rostliny (vlevo) vybočuje ze svislé osy listové pochvy. Listy *d2-2* (vpravo) jsou vzpřímené. Proužek = 5 cm. (D) Lata kontrolní rostliny (vlevo) a *d2-2* (vpravo). Proužek = 5 cm. (E) Obilky mutantních rostlin (vpravo) kontrolní (vlevo). Proužek = 1 cm. (převzato z Hong a kol., 2003)

Pokud jsou rostliny *d2* pěstovány ve tmě projevují typické znaky de-etiolizovaných rostlin. V době, kdy byl tento mutant objeven, nebylo jisté, jestli se u něho jedná o poruchu biosyntézy BR, proto byly provedeny testy, kdy byl aplikován brassinolid na rostlinu. A potvrdilo se, že fenotyp listových pochev může být zvrácen aplikací  $10^{-6}$  M BL. Se vzrůstající koncentrací aplikovaného BL dochází k prodlužování listových pochev druhých listů, kdy při koncentraci  $10^{-6}$  M BL je jejich délka srovnatelná s délkami pochev kontrolních rostlin (Hong a kol., 2003).

V mutantních rostlinách ani v kontrolních rostlinách nebyl detekován BL. CS byl detekován v *d2* rostlinách, ale jeho množství bylo redukováno na třetinu množství obsaženého v kontrolních

roślinach. Kromě CS obsahují *d2* rostliny redukovaná množství 6-deoxoCS, TY, 6-deoxoTY a 6-deoxo3DT. Avšak obsahují vyšší množství 6-deoxoCT a 6-oxoCN než kontrolní rostliny. Proto bylo pozorováno, jaký úhel svírají listy *d2* rostlin se stonkem po aplikaci brassinosteroidů. Největší účinek byl pozorován po aplikaci 3DT, 6-deoxo3DT a BL (Hong a kol., 2003).

*D2* gen byl lokalizován na krátkém raménku chromozomu 1. U *d2-1* byla nalezena mutace v exonu 1, která způsobila vytvoření předčasné stop kodonu (AAG → TAG) a u *d2-2* došlo k substituci (CCG → TCG) v exonu 4. Bylo zjištěno, že tento gen kóduje další protein ze zástupců P450 a to CYP90D2, který je podobný enzymům CPD/CYP90A, DWF4/CYP90B a DWARF/CYP85 (Hong a kol., 2003).

Na základě obsahu endogenních brassinosteroidů a testů spojených s exogenní aplikací brassinosteroidů došli autoři k závěru, že CYP90D2 bude katalyzovat přeměnu TE → 3DT a/nebo 6-deoxoTE → 6-deoxo3DT a bude tedy fungovat jako C-3 dehydrogenasa (Hong a kol., 2003). Nicméně biochemická studie provedená v *in vitro* podmínkách ukázala, že CYP90D2 a jeho homolog obsažený v rýži CYP90D3 katalyzují C-23 hydroxylaci různých 22-hydroxylovaných brassinosteroidů. V pozdní C6-oxidační dráze katalyzují přeměnu 6-deoxoCT → 6-deoxoTE (Sakamoto a kol., 2012).

#### **6.4. Mutant rýže – *dwarf11* (*d11*) (viz tab. 1)**

Mutant *d11* se řadí do velké skupiny trpasličích mutantů. Charakteristickými znaky pro toho mutantu jsou vzpřímené listy, celkově menší vzrůst, redukovaná délka druhého internodia a menší kulatá semena (Tanabe a kol., 2005). Redukovaná délka druhého internodia se vyskytuje i u dalšího mutant rýže *d2-1* (Hong a kol., 2003). Mutantní rostliny *d11* reagují na exogenní aplikaci BL v rozmezí koncentrací  $10^{-10}$  –  $10^{-6}$  M prodloužením listové pochvy druhého listu. Mutantní rostliny *d11* mají oproti kontrolním rostlinám delší bazální internodium, které se nachází pod hlavním květenstvím. Pokud jsou rostliny pěstovány ve tmě, nedochází k elongaci mezokotylu a internodií (Tanabe a kol., 2005).

I v tomto případě se jedná se o BR-deficitní mutanty, které neobsahují CT, 3DT ani BL (Tanabe a kol., 2005). BL nebyl doposud identifikován ani u nemutantních rostlin rýže (Hong a kol., 2002, 2003; Mori a kol., 2002). Mutantní rostliny *d11* obsahují redukované množství 24-MC, CN, 6-oxoCN, 6-deoxoCT, 6-deoxoTY, TY, 6-deoxoCS a CS oproti kontrolním rostlinám. Množství 6-deoxoTE obsahují vyšší, než je obsaženo v nemutantních rostlinách. Ačkoli byly identifikovány i další BR intermediáty výsledky neposkytly jednoznačný důkaz toho, který z biosyntetických kroků je poškozen (Tanabe a kol., 2005).

Protože endogenní analýzou nebylo možné určit krok, který tento enzym katalyzuje. Tak se využilo testu, při kterém se zjišťoval úhel, který svírá listová čepel s její listovou pochvou po aplikaci BR. Nemutantní rostliny reagovaly vzrůstem úhlu na všechny aplikované BR intermediáty. Mutantní rostliny *d11* reagovaly vzrůstem úhlu pouze na 6-deoxoTY, TY, 6-deoxoCS, CS a BL (Tanabe a kol., 2005).



Lokus *d11* byl lokalizován na dlouhém raménku chromosomu 4. Identifikovány byly čtyři alely *d11*. Jedná se o *d11-1* (delece jedné báze v exonu 2), *d11-2* (inzerce báze v exonu 7), *d11-3* (substituce v exonu 4) a *d11-4* (substituce poslední báze v intronu 3). Nejvyšší koncentrace *D11* mRNA byla nalezena v internodiích a květech před kvetením. Exprese genu probíhala rovněž ve výhoncích, kořenech a květech po kvetení. V porovnání s nemutantními rostlinami je aberantní *D11* mRNA akumulována v *d11* mutantech. Po aplikaci BL je její množství výrazně redukováno, což značí, že gen je zpětně regulován BL (Tanabe a kol., 2005). Nakonec bylo zjištěno, že gen *D11* kóduje cytochrom P450 (CYP724B1), jehož role v biosyntéze BR však nebyla odhalena (Tanabe a kol., 2005).

#### 6.5. Mutant rýže – *sg4* (viz tab. 1)

V nedávné studii Shi a kol. (2015) objevili nového mutantu, pojmenovaného *sg4* (*small grain 4*), který se vyznačuje tmavě zelenými, zvrásněnými a vzpřímenými listy. Má krátké laty a produkuje malé kulaté obilky. Od ostatních mutantů ho odlišuje to, že je v dospělosti vyšší než kontrolní rostliny bez mutace. A vytváří šest internodií, což je o dvě internodia více než u kontrolních rostlin. Pokud jsou mutantní rostliny *sg4* pěstovány ve tmě nedochází k prodloužení mezokotylu. Rostliny odpovídají na exogenní aplikaci brassinosteroidů. Mutant *sg4* má významně sníženou expresi *SG4* mRNA v kořenech a stoncích, ale zvýšenou koncentraci *SG4* mRNA v listech a listových pochvách v porovnání s nemutantními rostlinami. V této studii se zjistilo, že se jedná o nového mutantu genu *D11*, u kterého dochází k inzerci 8 bp v místě 5'UTR.

#### 6.6. Mutant rýže – *lhdd10* (viz tab. 1)

Tento mutant a stejně jako ostatní mutanti zemědělských plodin je zkoumán kvůli výnosu. Má typický fenotyp BR-deficitních mutantů, tmavě zelené vzpřímené listy, krátké listové pochvy a redukovanou fertilitu. Buňky má oproti kontrolním rostlinám zkrácené, což se odráží v jeho trpasličím vzrůstu. Projevuje se u něj opožděná doba kvetení. Oproti kontrolním rostlinám začíná kvést o 20 - 24 dnů později. Rozmezí je dáno tím, zdali jsou rostliny pěstovány za dlouhého nebo krátkého dne. Za dlouhého dne dochází k většímu opoždění kvetení (Liu a kol., 2016).

Od ostatních BR-deficitních mutantů rýže se však *lhdd10* odlišuje délkou internodií. Všechna internodia má *lhdd10* stejně zkrácená (Liu a kol., 2016). Zatímco prozatím identifikování mutanti mají charakteristické prodlužování a zkracování internodií. Protože *brd1* má kompletně redukovanou výšku (Mori a kol., 2002; Hong a kol., 2002), *d2-1* a *d11* mají redukovanou délku druhého internodia (Hong a kol., 2003; Hong a kol., 2005, Tanabe a kol., 2005) a naopak *brd2* má prodloužené pouze první internodium (Hong a kol., 2005). Po aplikaci  $10^{-6}$  M BL dochází u *lhdd10* k inhibici růstu kořenů (Liu a kol., 2016).

Mutant *lhdd10* má zvýšený obsah chlorofylu *a* a chlorofylu *b* oproti kontrolním rostlinám, ale není rozdíl v poměru chlorofylu *a/b*. To znamená, že *lhdd10* by mohl mít vliv na biosyntézu

chlorofylu. Pomocí QRT-PCR bylo zjištěno, že u *lhdd10* mutantních rostlin je stimulována vyšší exprese genů kódujících enzymy biosyntézy chlorofylu: Mg-protoporphyrin IX methyltransferasu (CHLM) a H podjednotku Mg-chelatasy (CHLH). Transmisní elektronovou mikroskopií bylo zjištěno, že v *lhdd10* je obsažen větší počet chloroplastů na buňku a že chloroplasty obsahují větší množství gran, což způsobuje tmavší barvu listů (Liu a kol., 2016). Ke stejnému závěru došli autoři i při zkoumání tmavší barvy listů u mutantů huseníčku (Takahashi a kol., 1995; Azpiroz a kol., 1998)

Posunutý čas kvetení a fenotyp mutantních rostlin jsou řízeny recesivním genem *lhdd10*, který je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 10. K mutaci dochází v druhém exonu *Loc\_Os10g25780* a způsobuje substituci threoninu za isoleucin (Liu a kol., 2016). Gen *lhdd10* kóduje protein podobný proteinu DIMINUTO (Klahre a kol., 1998). K největší expresi genu *LHDD10* dochází v apikálních tkáních a mladých latách (Liu a kol., 2016).

## 7. Mutant vyskytující se u ječmene (*Hordeum vulgare* L.)

### 7.1. Mutant ječmene – *HvDWARF* (viz tab. 1)

V dnešní době je celkem dobře prozkoumána biosyntéza brassinosteroidů u dvouděložných rostlin, především modelové rostliny huseníčku. Bylo u nich identifikováno množství genů, který ovlivňují tento proces. Na druhou stranu se toho mnoho neví o syntéze BR u jednoděložných rostlin včetně obilnin.

Mezi jednu z mála zkoumaných plodin patří ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.). U kterého byla použita metoda vzniku mutanty působením MNU (N-methyl-N-nitrosourea) na semena, která byla máčena v 0,7 mM roztoku MNU. Poté byla identifikována řada mutantů, která vykazovala trpasličí fenotyp. Mutanti pocházeli ze tří různých variet ječmene (Aramir, Delisa, Diva) a z šlechtitelské linie ‘Q448’. Podrobněji však byly zkoumány především dva BR-deficitní aleličtí mutanti 522DK a 527DK pocházející z variety ‘Delisa’. Tyto mutantní rostliny se vyznačují poruchou etiolizace. V případě, kdy jsou pěstovány ve tmě, vypadají podobně jako rostliny pěstované na světle. Naproti tomu kontrolní rostliny Delisa rostoucí ve tmě mají zrychlený růst. Pozitivní reakci měly rostliny na exogenně aplikované BR, což znamená, že se jedná o BR-citlivé mutanty a jejich fenotyp je způsoben deficitem BR. Po aplikaci 24-epi-brassinolidu došlo k narovnání listových čepelí (Gruszka a kol., 2011).

Gen, který je v těchto mutantech postižen, byl označen jako *HvDWARF* (Gruszka a kol., 2011). Je to gen, který má 83% podobnost s genem *OsDWARF* vyskytující se u rýže (Hong a kol., 2002). Genem kódovaný protein *HvDWARF* je tvořený 472 aminokyselinami. U obou mutantů dochází při mutaci k substituci bází v nukleotidovém řetězci. Mutant 522DK má v pozici 1130 substituovaný guanin za adenin, což způsobuje změnu valinu na isoleucin. U mutantu 527DK dochází ke dvěma substitucím. K první substituci dochází v pozici 1434, kdy dochází ke změně adeninu

na guanin. Tím se změní glutamin na arginin. K druhé substituci dochází v pozici 1507, kdy je cytosin vyměněn za thymin, ale bylo zjištěno, že se jedná o tichou mutaci (Gruszka a kol., 2011).

Tyto mutantní rostliny byly využity k pokusům, kdy byly srovnávány rostliny, které byly stresovány suchem a rostliny zalévané. U stresovaných 527DK rostlin některé parametry fotosyntézy, především fluorescence chlorofylu *a* rostly (ABS/RC, TR<sub>0</sub>/RC, ET<sub>0</sub>/RC, DI<sub>0</sub>/RC, V<sub>K</sub>, V<sub>J</sub> a M<sub>0</sub>) a jiné klesaly (F<sub>v</sub>, AREA,  $\Phi_{Po}$ ,  $\Psi_o$ ,  $\Phi_{Eo}$ , TR<sub>0</sub>/CS<sub>m</sub>, ET<sub>0</sub>/CS<sub>m</sub>, RC/CS<sub>m</sub>, a PI/ABS). Byly však u mutantů nižší než u kontrolních rostlin (Janeczko a kol., 2016).

Pokud jsou mutanti 522DK a 527DK pěstováni v optimálních podmínkách, tak obsahují redukované množství chlorofylu *a* i chlorofylu *b* (8-26 %), nepatrně vyšší množství karotenoidů a jejich aktivita Rubisca je redukovaná na 22-32%. Mají zvýšený obsah glukosy a fruktosy, ale mají snížený obsah sacharózy. Oba mutanti obsahují dvakrát menší množství prolinu než kontrolní rostliny. Porucha v syntéze brassinosteroidů způsobuje redukovanou produkci ABA a cytokininu, ale nezpůsobuje redukci auxinu. Mutantní rostliny mají snížený obsah *trans*-zeatinu (Janeczko a kol., 2016).

## 8. Mutant vyskytující se u bobu (*Vicia faba* L.)

### 8.1. Mutant bobu – *bdd1* (*brassinosteroid deficient dwarf 1*) (viz tab. 1)

U bobu obecného variety Rinrei se vyskytuje jeden z trpasličích mutantů *bdd1*. Mutace u něj byla způsobena  $\gamma$ -ozářením nezmutované variety Niigata. Charakteristickými fenotypovými znaky pro mutantní rostliny jsou vzpřímený stonek, redukovaná délka internodií a tmavě zelená barva listů. Porovnáním mutovaných rostlin variety Rinrei s nemutovanými rostlinami označovanými jako Mild-green (varieta Niigata) se zjistilo, že mutované rostliny mají zvýšenou hodnotu SPAD (132%), která udává relativní obsah chlorofylu. Dále mají redukovanou celkovou výšku rostliny (73%), hmotnost čerstvé biomasy (46%), délku internodií (52%) a délku řapíků (67%). Dospělé mutantní rostliny jsou méně rozvětvené, ale obsahují stejný počet internodií na větvi. Počet lusků je snížen téměř na polovinu (Fukuta a kol., 2004).

Velikost lusků a semen je redukována na 80% průměrné velikosti vyskytující se u nemutantních rostlin. Semena jsou v luscích *bdd1* rostlin těsně u sebe a mají na rozdíl od nemutantních rostlin omezený prostor k vývoji. Se zvyšujícím se počtem semen v luscích *bdd1* rostlin se jejich velikost zmenšuje, ale u nemutantních rostlin zůstává velikost semen konstantní. Pokud je v lusu obsaženo pouze jedno semeno, tak jeho velikost odpovídá velikosti semene nemutantní rostliny. Aplikací BL bylo docíleno zvětšení velikosti semen a lusků, které obsahovali tři semena (Fukuta a kol., 2006).

V případě, kdy jsou rostliny pěstovány ve tmě, se u nich projevuje etiolizace a nemutované rostliny mají dlouhé epikotyle s malými žlutými listy. Ten samý efekt má tma i na *bdd1* rostliny s tím rozdílem, že nemají tak dlouhé epikotyle jako nemutantní rostliny (Fukuta a kol., 2004).



Exogenní aplikace BL v různých koncentracích na první mladé nevyvinuté listy způsobuje prodloužení internodií a řapíků. Velikost odpovědi závisí na koncentraci aplikovaného BL. Se vzrůstající koncentrací roste i délka řapíků a internodií. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo při aplikaci 1000 ng BL na rostlinu. Při této koncentraci však klesá hodnota SPAD. Aplikace gibberellinu (GA<sub>3</sub>) na Rinrei rostliny neměla téměř žádný účinek (Fukuta a kol., 2004).

Pomocí metody GC-MS byla provedena analýza endogenního výskytu brassinosteroidů a sterolů. U *bddl* rostlin nebyl zjištěn obsah CS ani BL. Avšak u nemutantních rostlin byl zjištěn výskyt CS. Obsah zjištěných BR byl u *bddl* rostlin nižší než u nezmutovaných. Pro obě variety platí, že obsah 6-deoxo derivátů je vyšší než 6-oxo derivátů. Obsah 24-MC byl 33-krát vyšší a obsah isofucosterolu byl 16-krát vyšší u *bddl* rostlin než u nemutantních rostlin. *bddl* rostliny obsahovaly velmi malé množství CR a CN z množství obsaženého v kontrolních rostlinách. Za chybný krok je považována přeměna 24-methylencholesterolu na campesterol (Fukuta a kol., 2004).

Rinrei mutant *bddl* (*brassinosteroid deficient dwarf 1*) (Fukuta a kol., 2004) je považován za homolog *dwf1* (*dim*, *cbb1*) u huseníčku (Takahashi a kol., 1995; Klahre a kol., 1998; Choe a kol., 1999b) a *lkb* u hrachu (Nomura a kol., 1999; Schultz a kol., 2001). Křížením mutantních Rinrei rostlin a nemutantních rostlin bylo zjištěno, že se jedná o recesivního mutantu (Fukuta a kol., 2004).

## 9. Mutant vyskytující se u povíjnice (*Pharbitis nil* L.)

### 9.1. Mutant povíjnice – *kbt* (viz tab. 1)

Charakteristickým znakem pro tohoto mutantu jsou tmavě zelené zprohýbané listy, které mají své okraje podtočené dolů. Tyto rostliny mají potlačenou elongaci internodií. V porovnání s kontrolními rostlinami jsou extrémně malé. Vyskytuje se u nich zpožděná senescence listů, což znamená, že v případě, že kontrolní rostliny žloutnou, tak *kbt* rostliny jsou stále ještě zelené. Fenotyp *kbt* lze ovlivnit postřikem 1 μM BL, který způsobí, že dojde k obnovení prodlužování internodií a listy jsou poté rovné, jako tomu je u kontrolních rostlin. Postřik GA<sub>3</sub> nemá na fenotyp rostlin žádný efekt. Stejný efekt jako má BL na *kbt* fenotyp, mají i jeho prekurzory CS, 6-deoxoCS a 6-deoxoTY. Což značí, že *kbt* patří do skupiny BR-deficitních mutantů (Suzuki a kol., 2003).

Mutant *kbt* obsahuje srovnatelné množství 24-MC, CR, 22-OHCR jako kontrolní rostliny. Obsahuje však vyšší množství (24R)-24-methyl-cholest-4-en-3-onu a (22S,24R)-22-hydroxy-24-methylcholest-4-en-3-onu naopak má nižší množství jejich metabolitů (24R)-24-methyl-5α-cholestan-3-onu a (22S,24R)-22-hydroxy-24-methyl-5α-cholestan-3-onu. Množství obsažených intermediátů časné a pozdní C-6 oxidační dráhy je u *kbt* mutantů nižší než v kontrolních rostlinách. Z těchto výsledků lze soudit, že *kbt* mutant má blokovanou přeměnu 4-en-3-onu a 22-OH-4-en-3-onu na jejich 5α-redukované formy (Suzuki a kol., 2003). Tento krok je blokován i u mutantu huseníčku *det2* (Noguchi a kol., 1999).

Gen *PnDET2* byl určený jako gen s největší homologií k *DET2*. Nukleotidová sekvence *PnDET2* měla 62% homologii ke genu *DET2*. Kódovaný protein čítá 266 aminokyselin a má roli steroidní 5 $\alpha$ -reduktasy. Avšak u *kbt* dochází k substituci adeninu za thymin v pozici 185, což má za následek změnu kyseliny glutamové na valin v pozici 62 proteinového řetězce. A tato bodová mutace v *PnDET2* má za následek fenotyp *kbt* (Suzuki a kol., 2003).

## 10. Mutanti vyskytující se u kukuřice (*Zea mays* L.)

### 10.1. Mutant kukuřice – *nana plant 1 (na1)* (viz tab. 1)

Doposud jsou známy pouze dva mutanti kukuřice *na1* (Hartwig a kol., 2011) a *brd1-m1* (Makarevitch a kol., 2012). Na základě podobnosti genů s geny nalezenými u huseníčku byly odhaleny pouze dva geny podílející se na biosyntéze brassinosteroidů u kukuřice a to geny *ZmDWF4* (Liu a kol., 2007) a *ZmDWF1* (Tao a kol., 2004).

Mutant *na1* dorůstá do výšky přibližně jedné třetiny výšky kontrolních rostlin. Jeho internodia jsou nestejněměrně zkrácená, ale nedochází ke změně počtu internodií (Hartwig a kol., 2011). Stejně jako u mutantů huseníčku i u tohoto mutantu dochází k redukci délky listové čepele na ~60% délky čepele kontrolních rostlin, ale její šířka zůstává stejná. Listy jsou vzpřímenější a zvlněné, což je pravděpodobně dáno změnou tvaru buněk a jejich vychýlením. U kontrolních rostlin jsou buňky seřazené v řadě kdežto u *na1* jsou vychýlené a dělají vlny (Hartwig a kol., 2011).

Podobně jako u ostatních mutantů, kteří nesou mutaci genu řídící biosyntézu brassinosteroidů, tak i u kukuřice dochází k de-etiolizaci rostlin. Mutantní rostliny mají redukovaný růst mezokotylů ve tmě, dorůstají pouhých 20% délky mezokotylů kontrolních rostlin. A tento proces nelze ovlivnit ani exogenní aplikací GA<sub>3</sub>, která je známá tím, že kontroluje růst ve tmě rostoucích sazenic kukuřice. Kukuřice patří mezi jednodomé rostliny s oddělenými jednopohlavnými květenstvími. U mutantu *na1* však dochází k tomu, že samčí květenství obsahují i množství samičích květů (Hartwig a kol., 2011).

Rostliny *na1* nesou mutaci genu *ZmDET2*, který se nachází na chromozomu 3 a který je orthologem genu *DET2* u huseníčku. Mutantní rostliny akumulují substrát NA1 enzymu (5 $\alpha$ -reduktasy) 4-en-3-on v téměř pětinasobném množství než je jeho obsah v kontrolních rostlinách. Naproti tomu obsahuje výrazně redukované množství všech intermediátů následujících za 4-en-3-onem v biosyntetické dráze BL. Redukovaný obsah BR způsobuje fenotyp *na1* rostlin. (Hartwig a kol., 2011).

### 10.2. Mutant kukuřice – *brd1-m1* (viz tab. 1)

Druhým mutantem identifikovaným u kukuřice je *brd1-m1*. Mutantní rostliny mají redukovanou výšku, dorůstají průměrné výšky 19 cm, která je 10-krát nižší než u kontrolních rostlin. Nedochází totiž k prodlužování internodií, což má za následek, že listy vyrůstají z jednoho místa. Listové čepele jsou zkroucené a jejich listové pochvy a jazýčky jsou kratší než u kontrolních rostlin.

Mají také inhibovaný růst kořenů. Jejich kořeny jsou třikrát kratší než kořeny kontrolních rostlin. Stejně jako v předešlém případě i u mutantu *brd1-m1* obsahují samčí květenství i samčí květy. Mutant patří mezi BR-deficitní mutanty a jeho fenotyp může být zvrácen exogenní aplikací BL. Pokud jsou rostliny *brd1-m1* pěstovány ve tmě, tak projevují de-etiolizovaný fenotyp. Rostliny *brd1-m1* nesou mutaci v genu *GRMZM2G103773*. Tento gen byl označen jako *brd1* (*brassinosteroid-deficient dwarf1*) a jeho mutantní alela jako *brd1-m1*. Gen *brd1* kóduje protein BRD1 (BR C-6 oxidasu), který byl určený jako CYP85A1 a katalyzuje poslední krok biosyntézy brassinosteroidů (Makarevitch a kol., 2012).

## 11. Diskuze a závěr:

Cílem této práce bylo shrnout dostupné poznatky o rostlinách, které nesou mutace genů biosyntézy brassinosteroidů. Hlavní otázkou bylo, jaké změny fenotypu způsobí daná mutace a k jakým biochemickým změnám dojde v rostlinách.

Nejvíce mutací genů bylo prozatím objeveno u huseníčku, ale v posledních letech se výzkum zabývá i hospodářskými plodinami, mezi které patří například rýže. Ačkoli různé druhy rostlin preferují rozdílné biosyntetické dráhy, přes které bude probíhat biosyntéza brassinosteroidů, u všech rostlin dochází ke změně množství brassinosteroidů v závislosti na mutaci. Bylo zjištěno, že u všech mutantních rostlin dochází ke snížení obsahu brassinosteroidů a akumulaci jejich prekurzorů před blokováním krokem.

Menší množství brassinosteroidů v rostlině má za následek typický fenotyp mutantních rostlin, který je charakterizován redukovanou výškou, redukovanou velikostí vegetativních i generativních rostlinných orgánů a tmavě zelenou barvou listů. Z toho plyne, že brassinosteroidy jsou důležitými fytohormony podporující prodlužování buněk v různých rostlinných orgánech, jako jsou hypokotyle, listové čepele a pochvy, řapíky, květní stopky a semena. Mnohé studie se proto začínají zabývat otázkou, jak zvýšit výnos semen hospodářských plodin pomocí brassinosteroidů, respektive pomocí identifikovaných genů řídících jejich biosyntézu.

Získané poznatky značí, že brassinosteroidy jsou také zodpovědné za regulaci růstu rostlin v závislosti na světelných signálech. U mutantních rostlin pěstovaných ve tmě se neprojevuje etiolizace. Kromě změny fenotypu dochází u mutantních rostlin i k opoždění doby kvetení. V těchto případech především tím, že se u nich prodlužuje vegetativní fáze vývoje rostlin.

Je však známo pouze málo informací o biochemických změnách v mutantních rostlinách. Autoři se ve svých studiích na mutantních rostlinách zabývají především biosyntetickými dráhami brassinosteroidů a enzymy, které je katalyzují. Z látek obsažených v rostlinách určují pouze množství brassinosteroidů, ale už se nezaměřují na to, jaké jiné biochemické změny mohou nastat vlivem daných mutací. Jen několik vědeckých skupin se zaměřuje na obsah látek, jako jsou rostlinné pigmenty, aminokyseliny nebo sacharidy v mutantních rostlinách. S rostlinnými pigmenty souvisí i

výzkum fotosyntézy, kterým se zabývali pouze Janeczko a kol. (2016). Jelikož brassinosteroidy jsou fytohormony, které ve spolupráci s dalšími fytohormony řídí vývoj rostliny, tak by se měl, podle mého názoru, další vývoj výzkumu zaměřit na studium dalších biochemických změn, které tyto mutace v rostlině způsobí.

**Tab. 1: Přehled morfologických a biochemických změn u mutantních rostlin**

ROSTLINA	NÁZEV MUTANTA	MUTOVANÝ GEN	MORFOLOGICKÉ ZMĚNY	BIOCHEMICKÉ ZMĚNY	ZDROJE
<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	<i>dwf1/dim</i>	<i>DIM/DWF1</i>	redukována výška, krátké hypokotyly, redukována délka kořenů, kulaté, zvlněné, tmavě zelené listy, krátké řapíky, extrémně krátká květenství s malými květy; ve tmě de-etiolizovaný fenotyp	akumulace 24-MC a isofucosterolu; nedetekovatelný obsah CS, TY a 6-deoxoTE	Takahashi a kol., 1995; Klahre a kol., 1998
	<i>dwf4</i>	<i>DFW4</i>	redukována výška, tmavě zelené kulaté listy, dvojnásobný počet listů v listové růžici, třikrát větší počet květenství, redukována délka nitek tyčinek; ve tmě de-etiolizovaný fenotyp	akumulace CN a 6-oxoCN	Azpiroz a kol., 1998; Choe a kol., 1998; Fujita a kol., 2006
	<i>dwf7</i>	<i>DWF7</i>	tmavě zelené kulaté listy, redukována výška, krátká robustní květenství, krátké květní stopky, šešule s redukováným počtem semen	akumulace episterolu a 24-epifungisterolu; redukováný obsah 5-dehydroepisterolu; téměř nedetekovatelný obsah 24-MC, CR a CN	Choe a kol., 1999a
	<i>dwf5</i>	<i>DWF5</i>	nízký robustní vzrůst, krátká internodia, tmavě zelené kulaté listy, krátké řapíky, květní stopky a šešule, větší množství květenství	redukové množství 24-MC, CR a CN	Choe a kol., 2000

ROSTLINA	NÁZEV MUTANTA	MUTOVANÝ GEN	MORFOLOGICKÉ ZMĚNY	BIOCHEMICKÉ ZMĚNY	ZDROJE
	<i>det2</i>	<i>DET2</i>	malé tmavě zelené listy, dvakrát větší počet listů v listové růžici, redukováná apikální dominance; ve tmě de-etiolizovaný fenotyp	akumulace 4-en-3-on, 22-OH-4-en-3-on; redukováný obsah CS a 6-deoxoCS; nedetekovatelný obsah TY a 6-deoxoTY	Chory a kol., 1991; Fujioka a kol., 1997; Li a kol., 1997; Noguchi a kol., 1999; Fujioka a kol., 2002
	<i>cpd</i>	<i>CDP</i>	redukováná výška, tmavě zelené malé listy; ve tmě de-etiolizovaný fenotyp	akumulace 22-OHCR; redukováný obsah 6-deoxo3DT a 6-deoxoCS; nedetekovatelný obsah 6-deoxoTE a 6-deoxoTY	Szekeres a kol., 1996; Ohnishi a kol., 2006; Ohnishi a kol., 2012
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>dpy</i>	?	redukováný vzrůst, tmavě zelené zkroucené listy podtočené dolů, redukováné postranní větvení stonku	-	Koka a kol., 2000
	<i>dwarf/ d<sup>x</sup></i>	<i>DWARF</i>	krátký hypokotyl, netvoří apikální háček, redukováný vzrůst	akumuluje 6-deoxoCS; neobsahuje CS	Bishop a kol., 1996; Bishop a kol., 1999
<i>Pisum sativum</i> L.	<i>lk</i>	<i>LK</i>	redukováná délka internodií, tmavě zelené listy, křehké lámavé stonky, krátké řapíky, zvýšená apikální dominance, menší počet kratších laterálních kořenů	redukováný obsah CS, 6-deoxoCS a 6-deoxoTY	Reid 1986; Nomura a kol., 2004
	<i>lkb</i>	<i>LKB</i>	redukováný vzrůst, redukováná délka internodií, silnější stonek, tmavě zelené epinastické listy	akumulace 24-MC; redukováný obsah BL, CS, 6-deoxoCS a TY	Nomura a kol., 1997; Nomura a kol., 1999; Schultz a kol., 2001

ROSTLINA	NÁZEV MUTANTA	MUTOVANÝ GEN	MORFOLOGICKÉ ZMĚNY	BIOCHEMICKÉ ZMĚNY	ZDROJE
<i>Oryza sativa</i> L.	<i>brd1</i>	<i>OsDWARF</i>	extrémně redukovaná výška, krátké zkroucené listové čepele, krátké listové pochvy, menší počet odnoží, kratší kořeny, ojediněle tvoří laty se sterilními obilkami	vyšší obsah 6-deoxoCS, 6-deoxo3DT a 6-deoxoTY; redukovaný obsah CS, TE a TY; BL nedetekován	Mori a kol., 2002; Hong a kol., 2002
	<i>brd2</i>	<i>DIM/DWF1</i>	redukovaná výška, prodloužené horní internodium, tmavě zelené vzpřímené listy, zkrácené listové pochvy, kratší a chudší kořenový systém, menší počet obilek	akumulace 24-MC, ostatní BR intermediáty značně redukované	Hong a kol., 2005
	<i>d2</i>	<i>D2</i>	redukovaná výška, výrazná redukce druhého internodia, vzpřímené listy, menší obilky; ve tmě de-etiolizovaný fenotyp	vyšší obsah 6-deoxoCT, 6-oxoCN; redukovaný obsah CS, 6-deoxoCS, TY, 6-deoxoTY a 6-deoxo3DT; BL nedetekován	Hong a kol., 2003; Sakamoto a kol., 1012
	<i>d11</i>	<i>D11</i>	redukovaná výška, redukovaná délka druhého internodia, vzpřímené listy, menší kulaté obilky; ve tmě de-etiolizovaný fenotyp	vyšší množství 6-deoxoTE; redukované množství 24-MC, CN, 6-oxoCN, 6-deoxoCT, 6-deoxoTY, TY, 6-deoxoCS a CS; nedetekován CT, 3DT a BL	Tanabe a kol., 2005
	<i>sg4</i>	<i>SG4</i>	větší počet internodií, tmavě zelené, zvrásněné a vzpřímené listy, krátké laty	-	Shi a kol., 2015

ROSTLINA	NÁZEV MUTANTA	MUTOVANÝ GEN	MORFOLOGICKÉ ZMĚNY	BIOCHEMICKÉ ZMĚNY	ZDROJE
	<i>lhdd10</i>	<i>LHDD10</i>	redukováný vzrůst, tmavě zelené vzpřímené listy, krátké listové pochvy	zvýšený obsah chlorofylu <i>a</i> i chlorofylu <i>b</i>	Liu a kol., 2016
<i>Pharbitis nil</i> L.	<i>kbt</i>	<i>PnDET2</i>	extrémně redukováný vzrůst, tmavě zelené listy s podtočenými okraji dolů	akumulace 4-en-3-onu a 22-OH-4-en- 3-onu	Suzuki a kol., 2003
<i>Vicia faba</i> L.	<i>bdd1</i>	<i>DIM/DWF1</i>	redukováná délka internodií, vzpřímený stonek, tmavě zelené listy, kratší řapíky, menší lusky	akumulace 24-MC a isofucosterolu; snížený obsah 6-oxo derivátů; téměř nedetekovatelný obsah CR a CN; nedetekovaný obsah CS a BL	Fukuta a kol., 2004
<i>Hordeum vulgare</i> L.	<i>HvDWARF</i>	<i>HvDWARF</i>	ve tmě de-etiolizovaný fenotyp	BR-deficitní, redukované množství chlorofylu <i>a</i> a <i>b</i> , zvýšený obsah karotenoidů, glukosy a fruktosy, redukováný obsah sacharózy, prolinu, kyseliny abscisové, cytokininu a <i>trans</i> - zeatinu	Gruszka a kol., 2011; Janeczko a kol., 2016
<i>Zea mays</i> L.	<i>na1</i>	<i>ZmDET2</i>	redukováná vzrůst, nestejnoměrně redukováná délka internodií, redukováná délka listové čepele, vzpřímené zvlněné listy; ve tmě de-etiolizovaný fenotyp	–	Hartwig a kol., 2011
	<i>brd1-m1</i>	<i>BRD1</i>	redukováný vzrůst; zkroucené listové čepele, zkrácené jazýčky a listové pochvy	-	Makarevitch a kol., 2012



## 12. Seznam použité literatury

- Azpiroz R., Wu Y., LoCascio J. C., Feldmann K. A. (1998): An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *The Plant Cell* **10**: 219-230
- \*Bajguz A. (2007): Metabolism of brassinosteroid in plants. *Plant physiology and Biochemistry* **45**: 95-107
- \*Bajguz A., Tretyn A. (2003a): The chemical structures and occurrence of brassinosteroids in plants. In: Hayat S., Ahmad A. (eds.): *Brassinosteroids: Bioactivity and Crop productivity*. Kluwer Academic Publishers pp. 1-44
- \*Bajguz A., Tretyn A. (2003b): The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* **62**: 1027-1046
- Bishop G. J., Harrison K., Jones J. D. G. (1996): The tomato *Dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *The Plant Cell* **8**: 959-969
- Bishop G. J., Nomura T., Yokota T., Harrison K., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Jones J. D. G., Kamiya Y. (1999): The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **96**: 1761-1766
- Choe S., Dilkes B. P., Fujioka S., Takatsuto S., Sakurai, Feldmann K. A. (1998): The *DWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 $\alpha$ -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Cell* **10**: 231-243
- Choe S., Dilkes B. P., Gregory B. D., Ross A. S., Yuan H., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Tanaka A., Yoshida S., Tax F. E., Feldmann K. A. (1999b): The *Arabidopsis dwarf1* mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiology* **119**: 897-907
- Choe S., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Tissier C. P., Gregory B. D., Ross A. S., Tanaka A., Yoshida S., Tax F. E., Feldmann K. A. (1999a): The *Arabidopsis dwf7/stel* mutant is defective in the  $\Delta^7$  sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Cell* **11**: 207-221
- Choe S., Tanaka A., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Ross A. S., Tax F. E., Yoshida S., Feldmann K. A. (2000): Lesions in the sterol  $\Delta^7$  reductase gene of *Arabidopsis* cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Journal* **21**: 431-443
- Choi Y.-H., Fujioka S., Harada A., Yokota T., Takatsuto S., Sakurai A. (1996): A brassinolide biosynthetic pathway via 6-deoxocastasterone. *Phytochemistry* **43**: 593-596
- Choi Y.-H., Fujioka S., Nomura T., Harada A., Yokota T., Takatsuto S., Sakurai A. (1997): An alternative brassinolide biosynthetic pathway via late C-6 oxidation. *Phytochemistry* **44**: 609-613
- Chory J., Nagpal P., Peto C. A. (1991): Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **3**: 445-459
- Feldmann K. A., Marks M. D., Christianson M. L., Quatrano RS (1989): A dwarf mutant of *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis. *Science* **243**: 1351-1354
- Ferguson B. J., Ross J. J., Reid J. B. (2005): Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea. *Plant Physiology* **138**: 2396-2405
- Fujioka S., Inoue T., Takatsuto S., Yanagisawa T., Yokota T., Sakurai A. (1995): Identification of a new brassinosteroid, cathasterone, in cultured cells of *Catharanthus roseus* as a biosynthetic precursor of teasterone. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **59**: 1543-1547

- Fujioka S., Li J., Choi Y.-H., Seto H., Takatsuto S., Noguchi T., Watanabe T., Kuriyama H., Yokota T., Chory J., Sakurai A. (1997):** The *Arabidopsis deetiolated2* mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Cell* **9**: 1951-1962
- Fujioka S., Noguchi T., Watanabe T., Takatsuto S., Yoshida S. (2000):** Biosynthesis of brassinosteroids in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* **53**: 549-553
- Fujioka S., Noguchi T., Yokota T., Takatsuto S., Yoshida S. (1998):** Brassinosteroids in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **48**: 595-599
- \*Fujioka S., Sakurai A. (1997a):** Brassinosteroids. *Natural Product Reports* **14**: 1-10
- \*Fujioka S., Sakurai A. (1997b):** Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Physiologia Plantarum* **100**: 710-715
- Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S. (2002):** An early C-22 oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway. *Plant Physiology* **130**: 930-939
- \*Fujioka S., Yokota T. (2003):** Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 137-164
- Fujita S., Ohnishi T., Watanabe B., Yokota T., Takatsuto S., Fujioka S., Yoshida S., Sakata K., Mizutani M. (2006):** *Arabidopsis* CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C<sub>27</sub>-C<sub>28</sub> a C<sub>29</sub> sterols. *The Plant Journal* **45**: 765-774
- Fukuta N., Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S., Fukuta Y., Nakayama M. (2004):** 'Rinrei', a brassinosteroid-deficient dwarf mutant of faba bean (*Vicia faba*). *Physiologia Plantarum* **121**: 506-512
- Fukuta N., Fukuzono K., Kawaide H., Abe H., Nakayama M. (2006):** Physical restriction of pods causes seed size reduction of a brassinosteroid-deficient Faba Bean (*Vicia faba*). *Annals of Botany* **97**: 65-69
- Griffiths P. G., Sasse J. M., Yokota T., Cameron D. W. (1995):** 6-deoxotyphasterol and 6-dehydro-6-deoxoteasterone, possible precursors to brassinosteroids in the pollen of *Cupressus arizonica*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **59**: 956-959
- Grove M. D., Spencer G. F., Rohwedder W. K., Mandava N., Worley J. F., Warthen J. D. Jr., Steffens G. L., Flippen-Anderson J. L., Cook J. C. Jr. (1979):** Brassinolide, a plant growth promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* **281**: 216-217
- Gruszka D., Szarejko I., Maluszynski M. (2011):** Identification of barely *DWARF* gene involved in brassinosteroid synthesis. *Plant Growth Regul* **65**: 343-358
- Hartwig T., Chuck G. S., Fujioka S., Klempien A., Weizbauer R., Potluri D. P. V., Choe S., Johal G. S., Schultz B. (2011):** Brassinosteroid control of sex determination in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **108** (49): 19814-19819. doi: 10.1073/pnas.1108359108.
- Hong Z., Ueguchi T., Umemura K., Uozu S., Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S., Ashikari M., Kitano H., Matsuoka M. (2003):** A rice brassinosteroid-deficient mutant, *ebisu dwarf* (*d2*) is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450. *The Plant Cell* **15**: 2900-2910
- Hong Z., Ueguchi-Tanaka M., Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S., Hasegawa Y., Ashikari M., Kitano H., Matsuoka M. (2005):** The rice brassinosteroid-deficient *dwarf2* mutant, defective in the rice homolog of *Arabidopsis* *DIMINUTO/DWARF1*, is rescued by the endogenously accumulated alternative bioactive brassinosteroid, dolichosterone. *The Plant Cell* **17**: 2243-2254
- Hong Z., Ueguchi-Tanaka M., Shimizu-Sato S., Inukai Y., Fujioka S., Shimada Y., Takatsuto S., Agetsuma M., Yoshida S., Watanabe Y., Uozu S., Kitano H., Ashikari M., Matsuoka M. (2002):** Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6 oxidase, prevents the

organized arrangement and polar elongation of cells in the leaves and stem. *The Plant Journal* **32**: 495-508

- Janeczko A., Gruszka M., Pocięcha E., Dziurka M., Filek M., Jurczyk B., Kalaji H. M., Kocurek M., Waligórski P. (2016):** Physiological and biochemical characterisation of watered and drought-stressed barely mutants in the *HvDWARF* gene encoding C6-oxidase involved in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* **99**: 126-141
- Kauschmann A., Jessop A., Koncz C., Szekeres M., Willmitzer L., Altmann T. (1996):** Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *The Plant Journal* **9**:701-713
- \*Khripach V., Zhabinskii V., Groot A. (2000):** Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Annals of Botany* **86**: 441-447
- Kim T.-W., Hwang J.-Y., Kim Y.-S., Joo S.-H., Chang S. C., Lee J. S., Takatsuto S., Kim S.-K. (2005):** *Arabidopsis* CYP85A2, a cytochrome P450, mediates the Baeyer-Villiger oxidation of castasterone to brassinolide in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Cell* **17**: 2397-2412
- Klahre U., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Yokota T., Nomura T., Yoshida S., Chua N.-H. (1998):** The *Arabidopsis* *DIMINUTO/DWARF1* gene encodes a protein involved in steroid synthesis. *The Plant Cell* **10**: 1677-1690
- Koka C. V., Cerny R. E., Gardner R. G., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S., Clouse S. D. (2000):** A putative role for the tomato genes *DUMPY* and *CURL-3* in brassinosteroid biosynthesis and response. *Plant Physiology* **122**: 85-98
- Kuperin L. V., Bey M. A., Back T. G., Pharis R. P. (2016):** Structure-function relationship of four stereoisomers of a brassinolide mimetic on hypocotyl and root elongation of the brassinosteroid-deficient *det2-1* mutant of *Arabidopsis*. *Journal of Plant Growth Regulation* **35**: 215-221
- Li J., Biswas M. G., Chao A., Russell D. W., Chory J. (1997):** Conservation of function between mammalian and plant steroid 5 $\alpha$ -reductases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **94**: 3554-3559
- Liu X., Feng Z. M., Zhou C. L., Ren Y. K., Mou C. L., Wu T., Yang C. Y., Liu S. J., Jiang L., Wan J. M. (2016):** Brassinosteroid (BR) biosynthetic gene *lhdd10* controls late heading and plant height in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports* **35**: 357-368
- Liu T., Zhang J., Wang M., Wang Z., Li G., Qu L., Wang G. (2007):** Expression and functional analysis of *ZmDWF4*, an ortholog of *Arabidopsis* *DWF4* from maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Reports* **26**: 2091-2099
- Makarevitch I., Thompson A., Muehlbauer G. J., Springer N. M. (2012):** *Brd1* gene in maize encodes a brassinosteroid C-6 oxidase. *PLoS ONE* **7**(1): e30798. doi:10.1371/journal.pone.0030798
- Mori M., Nomura T., Ooka H., Ishizaka M., Yokota T., Sugimoto K., Okabe K., Kajiwarra H., Satoh K., Yamamoto K., Hirochika H., Kikuchi S. (2002):** Isolation and characterization of a rice dwarf mutant with defect in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiology* **130**: 1152-1161
- Noguchi T., Fujioka S., Choe S., Takatsuto S., Tax F. E., Yoshida S., Feldmann K. A. (2000):** Biosynthetic pathways of brassinolide in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **124**: 201-209
- Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Sakurai A., Yoshida S., Li J., Chory J. (1999):** *Arabidopsis* *det2* is defective in conversion of (24R)-24-methylcholest-4-en-3-one to (24R)-24-methyl-5 $\alpha$ -cholestan-3-one in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiology* **120**: 833-839
- Nomura T., Jager C. E., Kitasaka Y., Takeuchi K., Fukami M., Yoneyama K., Matsushita Y., Nyunoya H., Takatsuto S., Fujioka S., Smith J. J., Kerckhoffs L. H. J., Reid J. B., Yokota T. (2004):** Brassinosteroid deficiency due to truncated steroid 5 $\alpha$ -reductase causes dwarfism in the *lk* mutant of pea. *Plant Physiology* **135**: 2220-2229

- Nomura T., Kitasaka Y., Takatsuto S., Reid J. B., Fukami M., Yokota T. (1999):** Brassinosteroid/sterol synthesis and plant growth as affected by *lka* and *lkb* mutations of pea. *Plant physiology* **119**: 1517-1526
- Nomura T., Kushihiro T., Yokota T., Kamiya Y., Bishop G., Yamaguchi S. (2005):** The last reaction producing brassinolide is catalyzed by cytochrome P-450s, CYP85A3 in tomato and CYP85A2 in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 17873-17879
- Nomura T., Nakayama M., Reid J. B., Takeuchi Y., Yokota T. (1997):** Blockage of brassinosteroid biosynthesis and sensitivity causes dwarfism in garden pea. *Plant Physiology* **113**: 31-37
- Ohnishi T., Godza B., Watanabe B., Fujioka S., Hategan L., Ide K., Shibata K., Yokota T., Szekeres M., Mizutani M. (2012):** CYP90A1/CPD, a brassinosteroid biosynthetic cytochrome P450 of *Arabidopsis*, catalyzes C-3 oxidation. *The Journal of Biological Chemistry* **287**: 31551-31560
- Ohnishi T., Szatmari A.-M., Watanabe B., Fujita S., Bancos S., Koncz C., Lafos M., Shibata K., Yokota T., Sakata K., Szekeres M., Mizutani M. (2006):** C-23 hydroxylation by *Arabidopsis* CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Cell* **18**: 3275-3288
- \*Rao S. S. R., Vardhini B. V., Sujatha E., Anuradha S. (2002):** Brassinosteroids – A new class of phytohormones. *Current Science* **82**: 1239-1245
- Reid J. B. (1986):** Internode length in *Pisum*. Three further loci. *lh*, *ls* and *lk*. *Annals of Botany* **57**: 577-592
- Sakamoto T., Ohnishi T., Fujioka S., Watanabe B., Mizutani M. (2012):** Rice CYP90D2 and CYP90D3 catalyze C-23 hydroxylation of brassinosteroids *in vitro*. *Plant Physiology and Biochemistry* **58**: 220-226
- \* Sakurai A. (1999):** Brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 351-361
- Schultz L., Kerckhoffs L. H. J., Klahre U., Yokota T., Reid J. B. (2001):** Molecular characterization of the brassinosteroid-deficient *lkb* mutant in pea. *Plant Molecular Biology* **47**: 491-498
- Shi Z., Rao Y., Xu J., Hu S., Fang Y., Yu H., Pan J., Liu R., Ren D., Wang X., Zhu Y., Zhu L., Dong G., Zhang G., Zeng D., Guo L., Hu J., Qian Q. (2015):** Characterization and cloning of *SMALL GRAIN 4*, a novel *DWARD11* allele that affects brassinosteroid biosynthesis in rice. *Science Bulletin* **60**: 905-915
- Suzuki H., Fujioka S., Takatsuto S., Yokota T., Murofushi N., Sakurai A. (1995a):** Biosynthesis of brassinosteroids in seedlings of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum* and *Oryza sativa*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **59**: 168-172
- Suzuki H., Inoue T., Fujioka S., Saito T., Takatsuto S., Yokota T., Murofushi N., Yanagisawa T., Sakurai A. (1995b):** Conversion of 24-methylcholesterol to 6-oxo-24-methylcholestanol, a putative intermediate of the biosynthesis of brassinosteroids, in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* **40**: 1391-1397
- Suzuki H., Inoue T., Fujioka S., Takatsuto S., Yanagisawa T., Yokota T., Murofushi N., Sakurai A. (1994):** Possible involvement of 3-dehydroteasterone in the conversion of teasterone to typhasterol in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **58**: 1186-1188
- Suzuki Y., Saso K., Fujioka S., Yoshida S., Nitasaka E., Nagata S., Nagasawa H., Takatsuto S., Yamaguchi I. (2003):** A dwarf mutant strain of *Pharbitis nil*, Uzukobito (*kobito*), has defective brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Journal* **36**: 401-410
- Szekeres M., Németh K., Koncz-Kálmán Z., Mathur J., Kauschmann A., Altmann T., Rédei G. P., Nagy F., Schnell J., Koncz C. (1996):** Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* **85**: 171-182

- Takahashi T., Gasch A., Nishizawa N., Chua N.-H. (1995):** The *DIMINUTO* gene of *Arabidopsis* is involved in regulating cell elongation. *Genes & Development* **9**: 97-107
- Tanabe S., Ashikari., Fujioka S., Takatsuto S., Yoshida S., Yano M., Yoshimura A., Kitano H., Matsuoka M., Fujisawa Y., Kato H. (2005):** A novel cytochrome P450 is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, *dwarf11*, with reduced seed length. *The Plant Cell* **17**: 776-790
- Tao Y., Zheng J., Xu Z., Zhang X., Zhang K., Wang G. (2004):** Functional analysis of *ZmDWF1*, a maize homolog of the *Arabidopsis* brassinosteroids biosynthetic *DWF1/DIM* gene. *Plant Science* **167**:743-751
- Verhoef N., Yokota T., Shibata K., de Boer G.-J., Gerats T., Vandenbussche M., Koes R., Souer E. (2013):** Brassinosteroid biosynthesis and signalling in *Petunia hybrida*. *Journal of Experimental Botany* **64**: 2435-2448
- \*Yokota T. (1997):** The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends in plant science* **2**: 137-143

\* hvězdičkou jsou označeny sekundární zdroje (review)